



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO

Farmacia

TESI DI LAUREA

Mitofagia e TFEB in salute e malattia

Mitophagy and TFEB in health and disease

RELATORE: PROF MONTOPOLI MONICA

CORRELATORE: PROF VISCOMI CARLO

LAUREANDO: IVANOVA MARIYA

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1.RIASSUNTO

-CAPITOLO I: I Mitochondri

- *Origine dei mitocondri
- *Struttura dei mitocondri
- *La Fosforilazione Ossidativa
- *I complessi mitocondriali
- *Mitochondri e Metabolismo cellulare
- *DNA mitocondriale: struttura
- *Alterazioni nel mtDNA
- *Stress mitocondriale e malattia
- *Omoplasma ed Eteroplasma
- *Tipi di malattie mitocondriali
- *Mutazioni puntiformi
- *MELAS
- *LHON
- *LS
- *MERRF
- *Delezioni del mtDNA singole e su larga scala
- *CPEO
- *KSS
- *Sindrome di Pearson
- *Alterazioni nelle proteine mitocondriali codificate nel nucleo

-CAPITOLO II: Che cos'è l'autofagia

- *L'autofagia come processo
- *Tipi di autofagia
- *I lisosomi
- *Ruolo fisiopatologico della mitofagia
- *la via PINK1/Parkin

-CAPITOLO III

- *La Famiglia della Microftalmia dei fattori di trascrizione MiT/TFE
- *L'espressione dei fattori di trascrizione MiT/TFE
- *Come è regolata l'(in)attività di TFEB?
- *Lo stress mitocondriale TFEB

3Scopo della tesi

4.RISULTATI

- *Creazione di una linea di fibroblasti immortalizzati esprimenti TFEB-GFP e TFEB-MYC
- *Traslocazione di TFEB con agonisti noti della mitofagia
- *Effetti sulla mitofagia

5.DISCUSSIONE

6.CONCLUSIONI

7.MATERIALI E METODI

8.BIBLIOGRAFIA

Riassunto

I mitocondri hanno un ruolo centrale sia nei processi fisiologici che patologici. Sono organelli che hanno il loro genoma distinto (mtDNA), che codifica per alcune proteine essenziali per l'attività dei complessi della catena respiratoria mitocondriale. Le altre proteine che compongono la catena respiratoria sono codificate dal DNA nucleare. Mutazioni del DNA mitocondriale o nucleare causano una vasta gamma di malattie estremamente variabili, note come malattie mitocondriali primarie, caratterizzate da un deficit della fosforilazione ossidativa. L'incidenza di queste patologie è stimata in 1:5000 nati vivi. Le disfunzioni mitocondriali possono presentarsi, sia nella prima infanzia che nell'età adulta in associazione con una vasta eterogeneità clinica, caratterizzata da sintomi che interessano un qualsiasi organo o tipo di tessuto o coinvolgimento multisistemico. L'elemento comune, è però che i mitocondri disfunzionali non possono fornire l'energia necessaria ai tessuti con un'elevata richiesta di energia, come cuore, cervello e muscoli.

Non esistono cure per le malattie mitocondriali, ma alcuni approcci terapeutici sono stati proposti a livello sperimentale per combattere gli stress cellulari causati dagli organelli malfunzionanti. In particolare, è stato proposto che il mtDNA danneggiato possa essere eliminato dalla mitofagia. Nella mitofagia, i mitocondri bersaglio sono riconosciuti dagli autofagosomi e degradati dai lisosomi. La mitofagia, è quindi fondamentale per il mantenimento delle corrette funzioni cellulari.

La recente identificazione di TFEB come regolatore principale della macroautofagia /autofagia e della funzione del lisosoma suggerisce la possibilità che questo fattore possa essere un nuovo bersaglio per promuovere l'eliminazione dei mitocondri disfunzionali. Pertanto, gli agonisti del TFEB sono considerati come una strategia nuova e promettente per migliorare le malattie mitocondriali.

Introduzione

1. I Mitochondri

1.1 Origine dei mitocondri e morfologia

I mitocondri sono organelli di antica origine α -proteobatterica aerobica ancestrale, avvenuta per endocitosi circa 1,5-2 miliardi di anni fa (Kuhlbrandt W., 2015; Herst PM., et al., 2017). Si è evoluta una relazione simbiotica storica durante la quale i mitocondri sono diventati normali costituenti delle cellule eucariotiche nucleate (Chinnery PF., et Hudson G., 2013; Herst PM., et al., 2017). L'ipotesi endosimbiotica propone che le cellule eucariotiche anaerobiche originali abbiano inghiottito gli α -proteobatteri e si è stabilita una interazione favorevole per entrambi gli organismi. I mitocondri sono stati in grado di migliorare drasticamente la produzione di energia cellulare, generando adenosina trifosfato (ATP) attraverso la catena respiratoria, mentre la cellula ospite offriva un ambiente sicuro per la proliferazione batterica (...). La stretta omologia dei complessi della catena respiratoria batterica e mitocondriale è una prova per questa relazione avvenuta nell'evoluzione (Kuhlbrandt W., 2015).

I mitocondri sono tra gli organelli più voluminosi presenti nelle cellule. Hanno forma sferica o allungata. Queste forme aumentano il rapporto superficiale e il volume, inoltre, aumentano lo scambio di metaboliti tra i mitocondri e il citosol. I mitocondri sono in grado di rigonfiarsi e contrarsi in seguito ai processi metabolici o alla variazione della pressione osmotica nel mezzo ambiente. Le dimensioni di un mitocondrio sono all'incirca equivalenti a quelle del batterio di *Escherichia coli*. La maggior parte delle cellule eucariotiche contiene molti mitocondri, che collettivamente occupano fino al 25% del volume del citoplasma (Hamacher-Brady A., et Brady RB., 2016). Le uniche cellule che non possiedono mitocondri sono gli eritrociti. Il numero di mitocondri in una cellula, centinaia o migliaia nelle cellule dei mammiferi, è soggetto a regolazione per assicurare che sia adeguato al fabbisogno di ATP delle cellule. Il mitocondrio è un organello altamente specializzato, presente in quasi tutte le cellule eucariotiche e principalmente incaricato della produzione di energia cellulare attraverso la fosforilazione ossidativa (OXPHOS).

1.2 Struttura mitocondriale

I mitocondri sono organelli complessi, semiautonomi, citoplasmatici. Essendo di origine batterica i mitocondri sono circondati da una struttura a doppio strato, costituita da due tipi distinti di membrane fosfolipidiche (come evidenziato in figura 1.1), la membrana mitocondriale esterna (OMM), dotata di una grande permeabilità, perché costituita dalle cosiddette porine o canale anione selettivo a voltaggio dipendente (VDAC), che avvolge l'intero organello (Kuhlbrandt W., 2015) e la membrana mitocondriale interna (IMM). L'IMM è diversa da tutti gli altri sistemi cellulari dotati di membrane, perché nel suo scheletro lipidico non contiene colesterolo, bensì la cardiolipina (Killackey SA., et al., 2020), che è un fosfolipide acido. La presenza di cardiolipina rende l'IMM selettivamente permeabile agli ioni ed è importante per la formazione di gradienti transmembrana, necessari per la funzione mitocondriale. Questa membrana è dotata degli enzimi coinvolti nel trasporto degli elettroni e nella fosforilazione ossidativa, varie deidrogenasi e diversi sistemi di trasporto. L'IMM e l'OMM dividono l'organello in due spazi, i compartimenti della matrice e lo spazio intermembrana (IMS) che sono ambienti acquosi (Kuhlbrandt W., et al, 2015). IMS ha una composizione biochimica molto simile a quella del citoplasma. Contiene l'enzima specifico miochinasi, sono presenti anche le proteine proapoptotiche. La membrana interna contiene invaginazioni chiamate creste mitocondriali, che aumentano la sua superficie e dove sono localizzati i complessi della catena respiratoria (da I al IV) e dove la F1F0 ATP sintasi sintetizza l'adenosina trifosfato (ATP) (Kuhlbrandt W., 2015) .

La membrana mitocondriale interna, le creste e la matrice sono i siti dove avviene la maggior parte delle reazioni riguardanti l'ossidazione del piruvato a CO₂ e H₂O e la sintesi accoppiata di ATP da ADP e Pi; ciascuna di queste reazioni è compartimentata in una membrana o in uno spazio del mitocondrio. E' la membrana mitocondriale interna con le sue creste a costituire la principale barriera di permeabilità tra il citosol e la matrice mitocondriale e, dunque, a limitare la velocità del processo di ossidazione mitocondriale. L'IMM è caratterizzata da un rapporto proteine/lipidi più elevato. Le creste aumentano la capacità dei mitocondri di generare ATP. Oltre all'ETC (catena di trasporto degli elettroni) e alla F1F0ATP sintasi, le creste contengono macchinari molecolari per la traslocazione delle proteine, lo scambio di metaboliti, la morfologia mitocondriale, la traduzione delle proteine, la biogenesi ferro-zolfo e la degradazione delle proteine. Queste membrane definiscono topologicamente due compartimenti: lo spazio intermembrana, compreso tra le membrane esterna ed interna, e la matrice, o compartimento, che forma il lume circoscritto dalla membrana interna. L'IMM è

ulteriormente compartimentalizzato nella membrana di confine interna (IBM), giustapponendo l'OMM e le creste, che sono collegate all'IBM tramite giunzioni creste strette e sporgono nella matrice mitocondriale, espandendo la superficie dell'IMM.

1.3 La fosforilazione ossidativa

Attraverso i processi coordinati, i mitocondri catabolizzano gli equivalenti redox, derivati dall'assorbimento dei nutrienti, e li usano per fornire la maggior parte dell'energia cellulare sotto forma di ATP, attraverso una catena di reazioni che portano alla riduzione dell'ossigeno molecolare. La membrana interna è il luogo in cui avviene la fosforilazione ossidativa (OXPHOS) che è responsabile di questa produzione di energia ed è composto da cinque complessi multi-oligomericici presenti nella membrana mitocondriale interna che creano il gradiente elettrochimico di circa 180 mV che si accumula attraverso la membrana interna (Kuhlbrandt W., 2015). La catena respiratoria mitocondriale, con funzioni nella produzione di energia, nella regolazione della morte cellulare e nel metabolismo del calcio (Vercellino I., e Sazanov LA., 2022).

La fosforilazione ossidativa è un processo biochimico in cui gli elettroni vengono trasferiti dal complesso della catena respiratoria mitocondriale I, (NADH ossidasi) e il complesso della catena respiratoria mitocondriale II (succinato deidrogenasi) all'O₂ tramite elettroni all'interno della catena di trasporto degli elettroni (ETC). Il trasferimento di elettroni effettuato dalle reazioni redox attraverso i complessi da I a IV (citocromo ossidasi) della catena respiratoria riduce l'ossigeno molecolare in acqua. Il complesso della catena respiratoria mitocondriale V e i quattro complessi precedenti completano la fosforilazione ossidativa per generare ATP dall'adenosina difosfato (ADP) (Mazat JP., et al., 2020).

Questo processo è accoppiato alla traslocazione di protoni dalla matrice mitocondriale, allo spazio intermembrana (IMS). Il ritorno di protoni lungo il loro gradiente elettrochimico alla matrice attraverso l'ATPasi F₁F₀ genera l'energia necessaria per la sintesi di ATP (Galluzzi L., et al., 2012; Herst PM., et al., 2017). Questa distribuzione asimmetrica di protoni carichi

positivamente crea un potenziale di membrana composto da una componente chimica ed una elettrostatica, che hanno la caratteristica di un condensatore, e forniscono le forze chemiosmotiche ed elettromotrici che vengono sfruttate per fosforilare eventualmente ADP+Pi in ATP sintasi complesso mitocondriale. La respirazione è pertanto distinta ma accoppiata alla fosforilazione ossidativa. Tuttavia, una parte degli elettroni fugge al trasferimento lungo la catena respiratoria e va ridurre parzialmente l'ossigeno producendo le specie reattive dell'ossigeno (ROS) come il superossido di idrogeno che sono sottoprodotti tossici. Quindi il mitocondrio è un sito importante per la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno, dannose per proteine, lipidi e acidi nucleici (Herst PM., et al., 2017).

1.4 I complessi mitocondriali

La catena respiratoria mitocondriale è il mezzo con il quale il mitocondrio, svolgendo la fosforilazione ossidativa, assolve alle richieste di ATP della cellula.

La catena respiratoria è costituita da una serie di trasportatori di elettroni (complessi), la maggior parte dei quali sono proteine integrali della membrana interna, contenenti gruppi prostetici in grado di accettare e di donare uno o due elettroni.

Le conoscenze sulla sintesi di ATP si basano sulla teoria chemiosmotica, l'ipotesi proposta da Peter Mitchel nel 1961. In questa ipotesi è affermato che l'energia rilasciata durante il trasferimento di elettroni crea gradienti protonici (gradienti H) transmembrana, che alimentano la sintesi di ATP e spiega come l'ossidazione e la fosforilazione sono correlate.

Gli equivalenti riducenti sono il NADH (nicotinammide adenin dinucleotide) e il FADH₂ (flavina adenin dinucleotide), che trasferiscono gli elettroni ai complessi respiratori. Sono originari dal ciclo di Krebs (Saada A., 2014). Gli elettroni percorrono i centri redox di ogni complesso, da quello con il potenziale negativo verso quello con il potenziale positivo finché l'ossigeno molecolare si converte in acqua. In questo modo il trasporto degli elettroni lungo la catena diventa un processo esoergonico.

Il complesso I (NADH deidrogenasi) è il più grande e complicato enzima della catena respiratoria, composto da 44 subunità strutturali (sette delle quali sono codificate per mtDNA) e a causa del gran numero di subunità che formano il complesso I, il percorso di assemblaggio di questo enzima è particolarmente complesso e richiede il coinvolgimento di almeno 14 fattori ausiliari/ di assemblaggio (Hirst J., 2013). Il complesso I catalizza il trasferimento di due elettroni dal NADH al coenzima Q nella membrana.

La succinato deidrogenasi (SDH), è un complesso di membrana integrale di circa 120 kDa e, a differenza degli altri complessi del sistema OXPHOS, è coinvolta sia nel ciclo degli acidi tricarbossilici (dove metabolizza il succinato in fumarato) sia nella catena respiratoria (trasferendo gli elettroni dal FADH₂ per ridurre l'ubichinone in ubichinolo) (Alston LC., et al., 2017). Inoltre è l'unico complesso della catena che non pompa protoni attraverso la membrana ed è interamente codificato dal DNA nucleare (Mazat JP., et al., 2020; Mustafa MF., et al., 2020). Anche come struttura è il più semplice di tutti i complessi respiratori.

L'ubichinolo-citocromo c ossidoreduttasi, o complesso III della catena respiratoria, è l'elemento centrale della catena respiratoria, il meglio compreso dei complessi respiratori. Forma un omodimero che trasferisce gli elettroni dall'ubichinolo ridotto al citocromo b e quindi alla piccola proteina solubile citocromo c (Alston LC., et al., 2017). Questo processo redox è accoppiato con la traslocazione di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana. Il complesso III, è composto da 11 subunità strutturali più due gruppi eme e la proteina Rieske ferro-zolfo. Il citocromo b crea un ciclo che permette all'ubichinone di interagire con un solo elettrone fornito dal centro Fe-S. Al completamento del ciclo l'ubichinone si riduce a ubichinolo acquistando dalla matrice due protoni.

La citocromo c ossidasi (COX), o complesso IV della catena respiratoria, è l'accettore terminale della catena respiratoria di elettroni, incorporata nella membrana mitocondriale interna e funge da dimero, con due siti di legame, due gruppi eme, uno ione magnesio e uno ione zinco. Il complesso IV pompa i protoni attraverso la membrana mitocondriale interna, contribuendo alla forza motrice del protone per lo sfruttamento dell'ATP sintasi e sposta elettroni dal citocromo c all'ossigeno molecolare ai terminali della catena respiratoria per formare acqua dalla metà del numero di protoni, l'altra metà va pompata nello spazio intermembrana (Kuhlbrandt W., 2015). Il complesso IV ha una massa molecolare di 200 kDa, ha 13 subunità strutturali, tre dei quali sono codificate da mtDNA, 10 da nDNA, che costituiscono l'unità funzionale del complesso e almeno 26 proteine aggiuntive coinvolte nell'assemblaggio e nella biogenesi (Rak M., et al., 2016; Alston LC., et al., 2017).

L'ATP sintasi, o complesso V, è l'enzima molecolare multimerico che guida la sintesi di ATP attraverso la fosforilazione dell'ADP, sfruttando il gradiente protonico transmembrana generato dal trasporto di elettroni e da parte della catena respiratoria. È costituito da un complesso multimerico di 600 kDa è formato da 13 diverse subunità (alcune delle quali hanno diverse isoforme; ad esempio, ATP5G1, ATP5G2 e ATP5G3 codificano le isoforme della subunità c) e coinvolge almeno tre fattori accessori. (Alston LC., et al., 2017). Ha due domini distinti: il dominio F1 e F0.

I complessi respiratori I, III e IV si assemblano fra di loro in più grandi complessi, noti come supercomplessi. Questi supercomplessi formati dai complessi I, III, IV sono chiamati respirasomi e contengono anche i vettori mobili degli elettroni ubichinone/ubichinolo e il citocromo c (Hirst J., 2018). La loro funzione è tuttora soggetto di dibattito (Kuhlbrandt W., 2015; Milenkovic D., et al., 2017). Sembra che i supercomplessi possono influenzare l'assemblaggio, la stabilità e l'attività dei complessi respiratori e anche diminuire la formazione dei radicali liberi dell'ossigeno. Il respirasoma regola il flusso degli elettroni (Saada A., 2014)

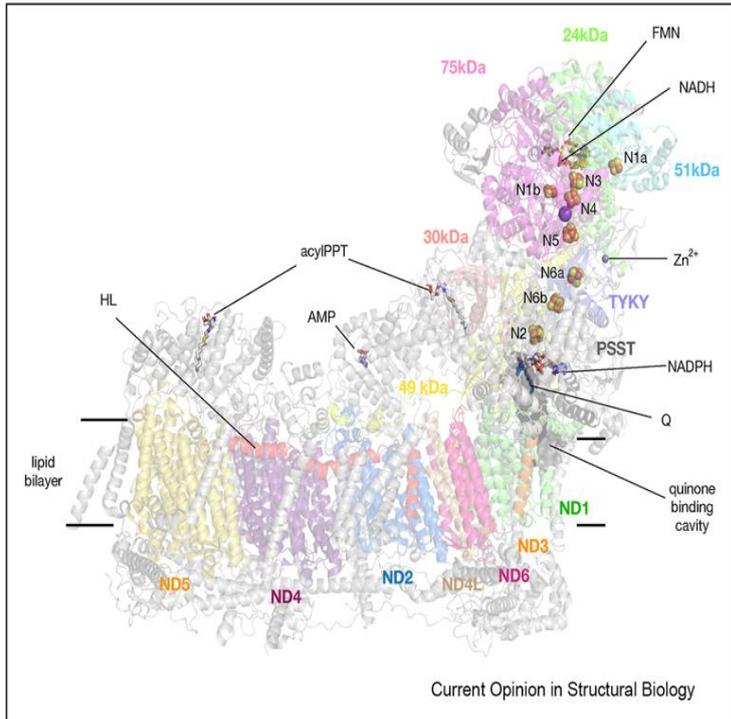


Figura : Struttura del complesso I

nei mammiferi

Struttura del complesso I con le principali 14 subunità colorate ed annotate e le restanti subunità soprannumerarie in grigio. Substrati e cofattori sono annotati.

(Kampjut D., et Sazanov LA., 2022)

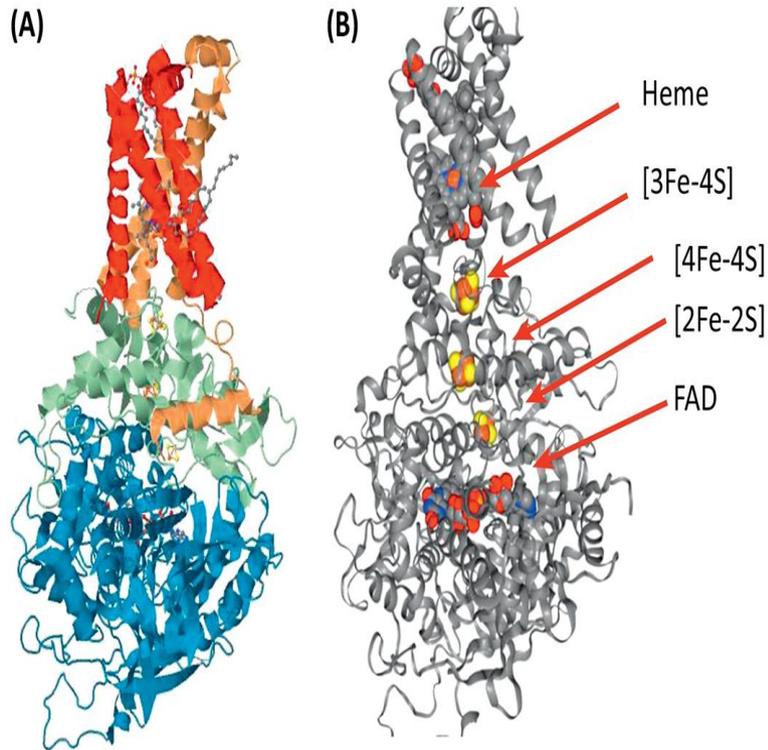


Figura: Struttura cristallina del complesso II (SDH) isolata dai mitocondri del cuore suino e dai suoi tre gruppi prostetici.

(A) Sono mostrate le subunità SDH

BLU SDHA

VERDE SDHB

MARRONE SDHC

ROSSO SDHD

(B) Evidenziati i gruppi prostetici di SDH ed icluster Fe-S

(Bezawork-Geleta A., et al., 2017)

1.5 Mitocondri e Metabolismo cellulare

Il funzionamento efficiente dei mitocondri è essenziale per lo svolgimento di diversi ruoli essenziali in una varietà di processi cellulari, tra cui la produzione di NADH e GTP principalmente attraverso il ciclo di Krebs (nel ciclo degli acidi tricarbossilici) e la produzione di ATP per l'energia cellulare mediante la fosforilazione ossidativa (OXPHOS), oltre a numerose vie biosintetiche connesse, come la biosintesi di nucleotidi, la biosintesi dei fosfolipidi di membrana e amminoacidi a catena ramificata e glutammina, ciclo dell'urea, gluconeogenesi e chetogenesi (Rossman M., et al., 2021), nella β -ossidazione degli acidi grassi, e nella biosintesi degli ormoni steroidei e dell'eme (Galluzzi L., et al., 2012; Picca A., et al., 2021).

I mitocondri sono coinvolti nella biogenesi e nella maturazione di diversi cofattori, come i cluster di eme, biotina o ferro-zolfo (Fe/S). Nonostante la semplicità chimica dei cluster Fe/S, la loro biosintesi richiede più di due dozzine di proteine negli eucarioti e avviene sia nei mitocondri che nel citosol (Pacheu- Grau D., et al., 2018). Tutti questi processi probabilmente sono associati alla fisiopatologia delle varie malattie mitocondriali (Suomalainen e Battersby, 2017).

La dissipazione del gradiente protonico da parte delle proteine disaccoppianti (UCP) genera calore anziché energia e questo gioca un ruolo importante durante esposizione al freddo o/e regolano la termogenesi. I mitocondri riutilizzano anche i prodotti di scarto generati da diverse vie metaboliche cellulari, come l'ammoniaca e l'idrogeno solforato. A basse concentrazioni, queste molecole agiscono come secondi messaggeri e possono attivare la trascrizione genica e innescare risposte cellulari, come la crescita cellulare, la produzione di antiossidanti cellulari o la stimolazione della biogenesi mitocondriale. Tuttavia, una volta superata una certa soglia, queste molecole possono provocare un danno ossidativo sotto forma di alterazioni del DNA mitocondriale (mtDNA) o di perossidazione lipidica, generando stress cellulare che può portare a morte cellulare. I mitocondri sono organelli coinvolti nell'approvvigionamento energetico, nella segnalazione di morte/sopravvivenza cellulare, nella necrosi, nell'autofagia, nella partecipazione del ciclo cellulare, il buffering del calcio e nell'immunità innata (Galluzzi et al., 2012). L'assorbimento mitocondriale di calcio non solo regola i livelli di calcio bivalente citosolico, che è cruciale per la contrazione muscolare, l'esocitosi e la trascrizione genica, ma modula anche almeno tre idrogenasi del ciclo di Krebs, regolando così il metabolismo energetico.

DNA mitocondriale: struttura

Il DNA a doppio filamento (dsDNA) dei mitocondri umani (mtDNA), è una molecola circolare comprendente solo 37 geni e lunga 16569 coppie di paia di basi con una massa molecolare di 10^7 Dalton. Si trova nella matrice mitocondriale in tutti i tipi di cellule e può essere trovata con numero di copie che vanno da diverse decine a migliaia di copie. I geni del mtDNA sono privi di introni e policistronici (Chinnery PF., et HudsonG., 2013), disposti in modo molto compatto su entrambe le eliche del DNA. Nell'uomo il genoma mitocondriale codifica per 13 polipeptidi altamente idrofobici della catena respiratoria (Hu SY., et al 2019), in particolare, per le subunità idrofobiche essenziali dei complessi di fosforilazione ossidativa (OXPHOS) I, III, IV e V, localizzati nella membrana interna mitocondriale e sono componenti essenziali per l'attività di OXPHOS. Questi includono 7 subunità del complesso I della catena respiratoria, 1 subunità del complesso III della catena respiratoria, 3 subunità del complesso IV e 2 subunità del complesso V, tutte richieste per la generazione di ATP mediante fosforilazione ossidativa. Inoltre, mtDNA contiene i geni per parte del macchinario biochimico necessario per la traduzione: 2 RNA ribosomiali (mt-rRNA, mitoribosomi 12S e 16S) e 22 RNA di trasferimento (mt-tRNA, usati per tradurre gli mRNA mitocondriali) (Hu SY., et al., 2019). Il mtDNA è altamente compattato mediante il fattore di trascrizione mitocondriale TFAM (Yan C., et al., 2019; Mustafa MF., et al., 2020) in un aggregato associato a un certo numero di proteine e organizzato in nucleoidi discreti, di circa 100 nm di diametro (Kuhlbrandt W., 2015), localizzati all'interno della matrice mitocondriale, e distribuito attraverso la rete mitocondriale in prossimità della membrana mitocondriale (Herst PM., et al., 2017). Ciascuno di questi nucleoidi contiene una molecola di DNA mitocondriale. Gli rRNA e i tRNA mitocondriali costituiscono una macchina per la sintesi di 13 polipeptidi. La stragrande maggioranza delle proteine mitocondriali, tuttavia, è codificata dal genoma nucleare e viene importata nei mitocondri da sistemi di traslocazione localizzati alle membrane mitocondriali esterne ed interne.

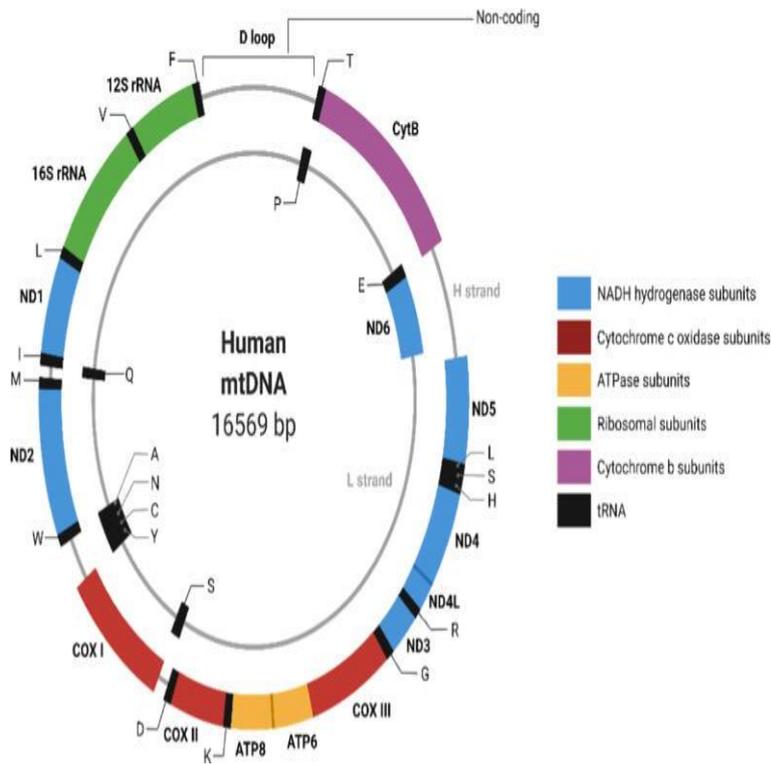


Figura 1: Figura DNA

mitocondriale umano.

Il genoma mitocondriale umano è organizzato come una molecola circolare a doppio filamento interno (leggero) e esterno (pesante), contenente 37 geni. 28 sul filamento pesante e 9 sul filamento leggero.

Sono mostrati i geni che codificano per la catena respiratoria mitocondriale.

Aldossary MA., et al., 2022

La struttura del mtDNA è significativamente diversa da quella dell'nDNA, tuttavia, simile al cromosoma batterico, il mtDNA forma un DNA a doppio filamento circolare in quasi tutti i metazoi. La struttura a doppio filamento del mtDNA consiste in un filamento senso chiamato pesante (H) ricco di guanina e un filamento antisenso, detto leggero (L), ricco di pirimidine (Mustafa MF., et al., 2020). Un polipeptide (ND6) e otto tRNA si trovano sul filamento L; gli altri 12 polipeptidi, due rRNA e 14tRNA sono codificati dal filamento H (Yan C., et al., 2019). L'organizzazione del mtDNA tra i vertebrati è simile a quella degli esseri umani, con la maggior parte del DNA non codificante che si trova all'interno di una regione di circa 1kb chiamata la regione non codificante (NCR). L'NCR è il sito più polimorfico all'interno del mtDNA con diversi polimorfismi noti all'interno di due regioni ipervariabili (HVR). Il sequenziamento degli HVR del mtDNA può essere utilizzato per attribuire aplogruppi mitocondriali ed è utile nel tracciare i lignaggi genetici delle popolazioni umane. La NCR svolge una funzione di regolamentazione all'interno del mtDNA, esercitando il controllo sulla trascrizione e sulla traduzione. A parte l'NCR, il resto della molecola del mtDNA è costituito da geni senza introni e spesso con frame di lettura sovrapposti tra geni adiacenti. La matrice mitocondriale è il sito della replicazione del DNA mitocondriale, della trascrizione e della traduzione. Il genoma mitocondriale si replica indipendentemente dal genoma dell'ospite. La regione di controllo del mtDNA contiene quasi tutta l'origine della replicazione per un filamento e l'origine della trascrizione per entrambi i filamenti. La regione di controllo è anche il sito del loop di spostamento (D-loop), che è una regione non codificante del mtDNA e che è essenziale per la replicazione e la trascrizione del mtDNA (Yan C., et al., 2019). Il D-loop fa solo parte della regione di controllo e non è analogo all'NCR (Mustafa MF., et al., 2020). Il D-loop è costituito da un triplo filamento di DNA contenente i filamenti pesanti e leggeri e un filamento pesante parzialmente replicato, legato a ponte d'idrogeno al filamento leggero. La replicazione del mtDNA inizia nel ciclo D, che contiene anche promotori di trascrizioni adiacenti al ciclo D. Sebbene l'esatta funzione del D-loop non sia chiara, è interessante notare che questa regione è soggetta a un'elevata variabilità di sequenza genica contigua e in parte sovrapposta, e ha dimostrato di essere associata all'incidenza di particolari tipi di cancro. Mutazioni nella regione di controllo mitocondriale sono state anche associate all'invecchiamento del muscolo scheletrico e dei fibroblasti cutanei.

La trascrizione del mtDNA è iniziata da due promotori sul filamento H (HSP1 e HSP2) (Chinnery PF., et Hudson G., 2013) e uno sul filamento L (LSP). I geni mitocondriali vengono trascritti come precursori policistronici che vengono successivamente processati in singoli RNA. mtDNA è trascritto in tre trascritti primari, il più breve dei quali ha origine in HSP1. Il secondo trascritto ha origine in HSP2 e continua per quasi l'intera lunghezza del mtDNA. Il terzo origina dall'LSP e copre tutta la lunghezza del genoma. Queste trascrizioni primarie vengono ulteriormente elaborate tramite processi sequenziali di scissione, poliadenilazione e modificazioni di tRNA e rRNA. Mentre l'abbondanza di mtDNA è chiaramente correlata con l'abbondanza di trascritti mitocondriali, gran parte degli effetti regolatori sulla trascrizione mitocondriale sono esercitati da proteine codificate nel nucleo.

Il DNA nucleare codifica per più di 22000 proteine, circa 1200 delle quali formano il proteoma mitocondriale (circa il 99% del mitoproteoma). Questi geni nucleari sono sintetizzati sui ribosomi citosolici, importati tramite i sistemi di traslocazione localizzati alle membrane mitocondriali esterne ed interne, attraverso un processo ATP dipendente. All'interno dei mitocondri, questi polipeptidi vengono quindi ulteriormente elaborati dalle mitoproteasi e piegati nelle loro forme attive all'ingresso della membrana esterna, attraverso il complesso TOM/TIM.

Alterazioni nel mtDNA

I disturbi mitocondriali primari comprendono un ampio gruppo di malattie genetiche umane, clinicamente eterogenee, causate da mutazioni patogene nei genomi mitocondriali e nucleari (Alston LC., et al., 2017; Almannai M., et al 2020). Di conseguenza, le malattie mitocondriali sono estremamente eterogenee clinicamente, biochimicamente e geneticamente. Questo è un grande ostacolo per la possibilità di raccogliere gruppi di pazienti numerosi e con simili malattie. I difetti nella distribuzione del DNA mitocondriale sono associati a molte malattie umane. A differenza del DNA nucleare, che è diploide e segue le leggi dell'ereditarietà mendeliana (autosomica o legata al cromosoma X), il mtDNA è ereditato esclusivamente dalla madre per via citoplasmatica (Yan C., et al., 2019), pertanto, solo la madre può trasmettere il mtDNA mutante alla prole. Sebbene il mtDNA codifichi proteine essenziali per OXPHOS, non è protetto dagli eventi mutazionali come l'nDNA. Il mtDNA subisce un alto tasso di mutagenesi, è considerato che evolve 10-20 volte più rapidamente rispetto al genoma nucleare.

Eziologia e fisiopatologia delle malattie mitocondriali

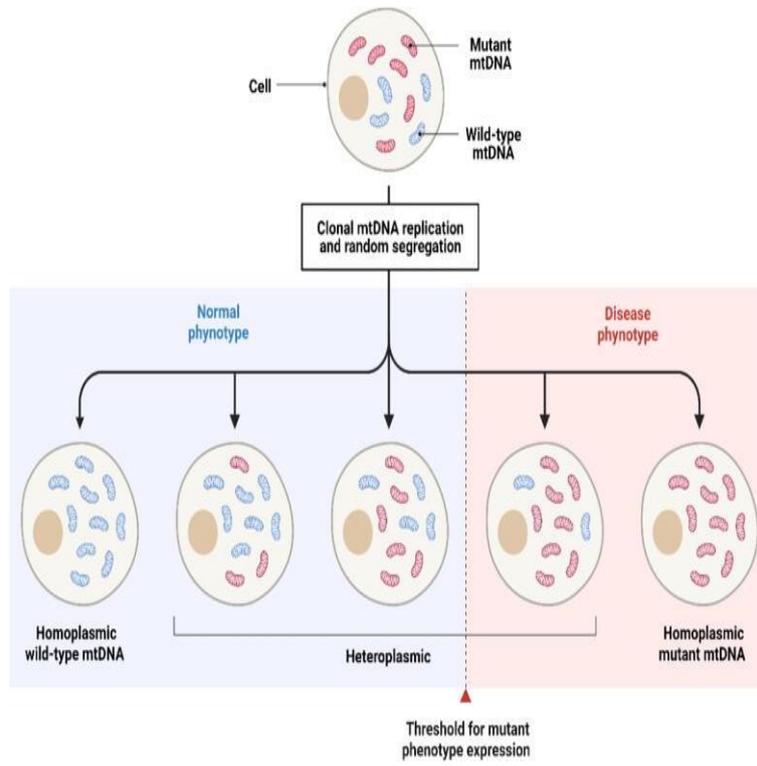
Alcune caratteristiche del genoma mitocondriale lo rendono particolarmente suscettibile a determinati danni ossidativi, indotti dallo stress rispetto al DNA nucleare, e predisposto a sviluppare mutazioni somatiche a causa della mancanza di protezione da parte del complesso istonico nella struttura (Yan C., et al., 2019; Aldossary MA., et al., 2022). Inoltre non vi sono introni. L'attività della DNA polimerasi γ (Pol γ) nei mitocondri ha un tasso di fedeltà relativamente basso rispetto alle polimerasi nucleari e questo causa un progressivo aumento di errori col tempo (Herst PM., et al., 2017; Aldossary MA., et al., 2022). Inoltre, mtDNA si trova nella matrice mitocondriale in prossimità dei siti di produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) alla catena respiratoria (Chinnery PF., et Hudson G., 2013; Herst PM., et al., 2017; Pacheu-Grau D., et al., 2018 ; Yan C., et al., 2019), aumentando il rischio di potenziali danni ossidativi, a carico del mtDNA (Mustafa MF., et al., 2020). Pertanto, il tasso mutazionale del genoma mitocondriale è molto più alto di quello del genoma nucleare.

La gravità della malattia causata da mutazioni nell'mtDNA dipende dalla natura della mutazione e dalla percentuale dell'mtDNA mutato presente in un particolare tipo cellulare rispetto a quello selvatico (Chinnery PF., et Hudson G., 2013). Cambiamenti patologici nel mtDNA possono apparire come mutazioni puntiformi nelle sequenze codificanti proteine, mt-rRNA o mt-tRNA. Inoltre i principali riarrangiamenti del mtDNA, come delezioni o inserimenti/duplicazioni, sono una causa di malattia. Le mutazioni puntiformi e le delezioni del mtDNA su larga scala rappresentano le due cause più comuni di malattia primaria del mtDNA. Le mutazioni puntiformi possono essere trasmesse dalla madre, mentre le seconde sono sempre sporadiche, cioè dovute a mutazioni de novo (Alston LC., et al., 2017).

Omoplasma ed Eteroplasma

La replicazione difettosa del genoma mitocondriale porta a una riduzione quantitativa delle copie di mtDNA (sindrome da deplezione) e può anche ostacolare la produzione di energia e generare stress cellulare. La porzione del mtDNA deleta contiene invariabilmente una o più specie di tRNA essenziali per la traduzione del mtDNA (Viscomi C., et Zeviani M., 2020; Aldossary MA et al., 2022). Ogni qualvolta una cellula somatica o germinale si divide l' mtDNA mutato e quello selvatico segregano nelle cellule figlie in modo casuale. Pertanto, il genotipo dell' mtDNA, che si propaga da una generazione alla successiva, può spostarsi casualmente verso la forma mutata o verso la forma selvatica. In condizioni normali, tutte le cellule di un organismo contengono molecole di mtDNA tutte uguali tra loro (omoplasma). Quando si verificano mutazioni, le cellule contengono una miscela di mtDNA mutato e normale (eteroplasma) (Chinnery PF., et Hudson G., 2013; Aldossary MA., et al., 2022). Se il livello di eteroplasma supera una certa soglia, si ha l'insorgenza di un difetto di OXPHOS e, potenzialmente, di una malattia Herst PM., et al., 2017).

Le mutazioni eteroplasmatiche causano spesso malattie multisistemiche. Esistono tuttavia anche mutazioni puntiformi omoplasmiche che in genere sono caratterizzate da un difetto relativamente lieve. Poichè tutti gli enzimi necessari alla replicazione e crescita dei mitocondri di mammifero, sono codificati nel nucleo e importati nei mitocondri dal citosol, si ritiene che l' mtDNA mutato non dovrebbe avere svantaggi di replicazione; anzi i mutanti con grandi delezioni dell' mtDNA dovrebbero avere un vantaggio selettivo in più, in quanto dovrebbero replicare più velocemente. Mutazione del mtDNA si accumulano nel tempo anche in individui normali, e sono state correlate a varie condizioni tra cui l'invecchiamento, il morbo di Parkinson, il morbo di Alzheimer, il cancro, ecc. Pertanto, il targeting del mtDNA mutante per ridurre il rapporto tra mtDNA mutante e WT è stato considerato strategia terapeutica.



Tipi di malattie mitocondriali

Le malattie mitocondriali potrebbero anche essere classificate in base alle mutazioni del genoma mitocondriale o del genoma nucleare, che interessano le vie metaboliche mitocondriali, e possono verificarsi come condizioni primarie e secondarie, associati all'età, attribuibili a mutazione somatica. Il DNA mitocondriale mutato a causa di stress indotti è associato strettamente a varie malattie umane e provoca mitocondri danneggiati e disfunzionali.

Mutazioni puntiformi del mtDNA

Le mutazioni puntiformi del mtDNA (comprese le piccole mutazioni indel) costituiscono una causa significativa di malattia umana, con una prevalenza stimata nella popolazione di uno su 200. Sono state riportate mutazioni in ogni gene del mtDNA e sono state associate a sintomi clinici che vanno dalla sordità neurosensoriale non sindromica alla MELAS.

MELAS

Come molte malattie gravi di origine mitocondriale, la MELAS (miopatia mitocondriale, encefalopatia, acidosi lattica e ictus) è una sindrome neurologica devastante caratterizzata prevalentemente, dall'encefalopatia mitocondriale, perdita dell'udito a entrambe le orecchie, l'acidosi lattica, che provocano convulsioni tonico-cloniche, episodi simili a ictus (Chinnery PF., et Hudson G., 2013; Mustafa MF., et al., 2020). C'è maggiore probabilità che si sviluppino aritmie. I sintomi clinici possono presentarsi con esordio precoce, nella maggior parte dei pazienti nell'infanzia, prima dei vent'anni o nell'età adulta e le mutazioni possono essere ereditate o verificarsi de novo. I difetti del mtDNA trasmessi per via materna possono coinvolgere una madre clinicamente sana che porta la mutazione familiare del mtDNA al di sotto della soglia richiesta per la disfunzione cellulare, sebbene i suoi ovociti presentano carichi di mutazione variabili, a causa delle pressioni selettive del collo di bottiglia mitocondriale. E' quindi quasi impossibile prevedere il rischio di recidiva per gravidanze successive, sebbene il test prenatale dei tessuti embrionali mediante l'uso della biopsia dei villi coriali o dell'amniocentesi possa fornire una misura accurata dell'eteroplasmia del mtDNA nel feto, che può influenzare le scelte riproduttive. Il rischio di recidiva di mutazioni puntiformi de novo del mtDNA è molto basso, ad eccezione del rischio di mosaicismi germinale negli ovociti materni.

La neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON) è la malattia mitocondriale primaria più comune, è una neuropatia ottica a cecità bilaterale, nella quale sono colpite esclusivamente le cellule gangliari retiniche (Baglivo M., et al., 2023) nei giovani maschi adulti (Chinnery PF., et Hudson G., 2013; Mustafa MF., et al., 2020). Questa malattia è ereditata dalla madre, principalmente causata da mutazioni puntiformi del mtDNA tra cui m.3460G>A (MT-ND1), m.11778G>A (MT-ND4) e m.14484T>C (MT-ND6), di cui m.11778G>A è la mutazione missenso più comune del gene mitocondriale che codifica la subunità 4 della NADH-CoQ reduttasi (complesso I) (Mustafa MF., et al., 2020), una proteina fondamentale per la produzione di ATP da parte del mitocondrio nelle cellule gangliari retiniche (Amore G., et al., 2021; Baglivo M., et al., 2023). Queste mutazioni possono alterare la funzione mitocondriale e aumentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno, portando all'apoptosi e alla degenerazione e atrofia del nervo ottico, che porta ulteriormente a una rapida perdita progressiva della visione binoculare.

La mutazione puntiforme dell'ATP6 (m.8993T>C o 8993T>G), che è la subunità centrale del complesso proteico V di OXPHOS, contribuisce alla sindrome di Leigh (LS) (Yan C., et al., 2019), nota anche come encefalomielopatia necrotizzante subacuta. La sindrome di Leigh è un grave disturbo neurologico mitocondriale, con prevalenza di 1 su 40000, che può essere causato da circa 90 mutazioni geniche, inclusi i genomi mtDNA e nDNA (Gerards M., et al., 2016). Viene spesso diagnosticato entro il primo anno di vita e generalmente provoca insufficienza respiratoria e morte entro due o tre anni.

L'epilessia mioclonica con fibre rosse sfilacciate (MERRF), che è una grave malattia neuromuscolare accompagnata da sintomi di epilessia mioclonica, miopatia, spasticità, demenza o atassia, è causata dalla mutazione puntiforme del tRNA (Chinnery PF., et Hudson G., 2013; Yan C., et al., 2019; Mustafa MF et al., 2020). Una mutazione nell'ansa T ψ CG dell'RNA mitocondriale codificante la lisina, causa la formazione di fibre muscolari frastagliate (i mitocondri sono assemblati in modo improprio, con movimenti del corpo incontrollati e discontinui)¹.

Delezioni del mtDNA singole e su larga scala

Le delezioni del mtDNA singole su larga scala hanno una frequenza di popolazione di 1,5/100000, che includono principalmente tre fenotipi associati: oftalmoplegia esterna cronica progressiva (CPEO), la sindrome di Kearns-Sayre e la sindrome di Pearson. A differenza dei riarrangiamenti dei geni nucleari, le delezioni del mtDNA singole e su larga scala spesso si verificano sporadicamente durante lo sviluppo embrionale e hanno un basso rischio di recidiva. Le donne clinicamente affette che presentano una delezione del mtDNA su larga scala hanno un basso rischio di trasmissione.

La CPEO è per lo più associata alla delezione di m.3243A>G (MT-TL1) ed è la presentazione più benigna attribuibile a singole delezioni, che si manifesta come paralisi progressiva dei muscoli oculari, con conseguenti disordini del movimento oculare e ptosi, che di solito compaiono nella tarda infanzia o nella prima età adulta (Heighton JN., et al., 2019).

La sindrome di Kearns- Sayre (KSS)

La KSS è una sindrome più grave della CPEO ed è principalmente associata alla delezione singola su larga scala di m.8993T>G (APT6). I pazienti con la sindrome di Kearns-Sayre, che è causata da delezioni singole su larga scala si presentano ad esordio precoce, prima dei 20 anni con ptosi e/o oftalmoplegia esterna cronica progressiva e retinite pigmentosa (Chinnery PF., et Hudson G., 2013) e possono avere un coinvolgimento multisistemico, inclusi miopatia progressiva, atassia o difetti della conduzione cardiaca (cardiomiopatia). Anche perdita dell'udito, funzione cognitiva compromessa e diabete. Kss è associata a grave demielinizzazione e spongiosi dei tratti della sostanza bianca del cervello, inclusi il cervelletto, il midollo spinale e il tronco cerebrale.

La sindrome di Pearson è la presentazione più grave associata a delezioni del mtDNA singole su larga scala. Spesso fatale durante l'infanzia, è una sindrome caratterizzata da insufficienza pancreatico-esocrina e anemia sideroblastica. Ci sono pochissimi casi (all'incirca 100 casi in tutto il mondo) che possono essere correlati alla delezione dell'ATPasi 6 e 8. La maggior parte

¹ Doblado., L., et al., 2021 nella loro recensione "Mitophagy in human disease" è sottolineato il fatto che il danno mitocondriale è collegato a tutte le forme di epilessia, sia genetiche che idiopatiche.

dei pazienti muore durante l'infanzia; tuttavia, una minoranza di pazienti che sopravvive fino all'età adulta tende a sviluppare i sintomi della sindrome KSS.

Mutazioni del mtDNA nei disturbi mitocondriali

Sindrome/malattia	Gene/complesso	Mutazione	Posizione del mutante nucleotide/aminoacido	
MELAS	MT-TL1	m.3243A>G m.3256C>T m.3271T>C		
LHON	MT-ND1, complesso I	m.3460G>A		
	MT-CO3, complesso IV	m.9804G>A		
	MT-ND4, complesso I	m.11778G>A		
	MT-ND6, complesso I	m.14459G>A m.14484A>G		
LS	MT-ATP6, complesso V	m.8993T>C		
	MT-ATP6, complesso V	m.8993T>G		
	MT-ND3, complesso I	m.10197G>A		
	MT-ND5, complesso I	m.13513G>A		
MERRF	MT-TK	m.8344A>G m.8356T>C m.8363G>A		
	MT-ND5, complesso I	m.13042A>T		
CPEO	MT-TV	m.1658T>C		
	MT-TL2	m.12315G>A		

Alterazioni nelle proteine mitocondriali codificate nel nucleo

A causa dei diversi ruoli cellulari che svolgono i mitocondri, ci sono molti processi mitocondriali che causano una patologia quando disturbati. Negli ultimi anni, gli approcci di sequenziamento massivo hanno aumentato significativamente il numero di mutazioni note implicate nelle malattie mitocondriali. Ne sono un esempio difetti in: fattori coinvolti nella biogenesi o integrità dei complessi della catena respiratoria, quelli che regolano il mantenimento del mtDNA, le proteine necessarie per la trascrizione degli elementi del mt-mRNA coinvolti nella traduzione delle proteine codificate nel mtDNA, i regolatori del metabolismo lipidico, i fattori coinvolti nella segnalazione cellulare e persino enzimi del ciclo di Krebs.

Oltre a queste gravi malattie, sta diventando sempre più chiaro che diverse malattie croniche legate all'età sono anche correlate a una funzione mitocondriale compromessa. Mentre i deficit mitocondriali non hanno necessariamente origine all'interno dei mitocondri, le mutazioni all'interno del mtDNA e le alterazioni degli enzimi di riparazione del mtDNA possono essere una causa diretta di patologie legate all'età come disturbi neurologici e diversi tumori.

Che cos'è l'autofagia

L'autofagia è un processo catabolico, citoprotettivo di degradazione per proteine intracellulari, macromolecole e organelli disfunzionali, dipendente dai lisosomi. Evolutivamente è molto conservato (Anding AL., et Baehrecke EH., 2017). La via autofagia-lisosoma è stimolata da molteplici stress cellulari, il principale dei quali è la scarsità di nutrienti, come gli aminoacidi. L'autofagia è suddivisa in macroautofagia, microautofagia e autofagia mediata da chaperone (CMA), a seconda delle dimensioni della struttura degradata, e può essere selettiva o non selettiva, a seconda che viene preso di mira qualsiasi componente cellulare specifico (Galluzzi et al., 2017). L'autofagia di per sé è un processo dinamico, il quale comporta il sequestro di componenti citoplasmatici come organelli e proteine in vescicole a doppia membrana che li avvolge (Anding AL., et Baehrecke EH., 2017) (Figura Anding). La macroautofagia è caratterizzata dalla formazione di un autofagosoma: il fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) di classe III produce il fosfatidilinositolo 3-fosfato (PI3P)(Anding AL., et Baehrecke EH., 2017) e si promuove la formazione della doppia membrana di isolamento, nota come fagoforo, a forma di mezzaluna in un sito subcellulare particolare, chiamato sito di assemblaggio, che si estende progressivamente in una sfera attorno a una porzione del citosol utilizzando due sistemi analoghi all'ubiquitina chiamati MAP1LC3/LC3 (proteina 1 associata ai microtubuli, catena leggera 3)-II, fino alla formazione di una vescicola a doppia membrana (l'autofagosoma). I carichi citoplasmatici vengono intrappolati in vescicola nell'autofagosoma citoplasmatico che si fonde con il lisosoma (organello contenente enzimi degradativi che possano scomporre molte proteine e biomolecole) a formare autolisosomi in cui il contenuto dell'involucro viene degradato idroliticamente. Questo processo è altamente regolato in diverse fasi, in particolare a livello di formazione di autofagosomi e degradazione del carico autofagosomico. Nella microautofagia, il carico citosolico viene inghiottito direttamente dai lisosomi mentre il CMA recluta selettivamente proteine bersaglio nei lisosomi attraverso proteine chaperone senza formazione di autofagosomi.

La macroautofagia, è la via di degradazione autofagica – lisosomiale che svolge un ruolo importante nell'eliminazione dei mitocondri disfunzionali e ridondanti attraverso uno specifico meccanismo di controllo della qualità chiamato mitofagia (Lemasters J. J., 2014). Tuttavia, attualmente, si ritiene che esistano tre tipi di mitofagia: 1- indotta dalla limitazione dei nutrienti, tipo 2- indotta da segnali di danno, e tipo 3-micro- mitofagia, legata a piccole vescicole derivate dai mitocondri (Lemasters JJ., 2014). Questi processi sono intrinsecamente diversi, perché il tipo 1 e il tipo 2 richiedono la fusione di un lisosoma per produrre un autofagosoma che circonda i mitocondri, mentre il tipo 3 no (Doblado L., et al., 2021). La mitofagia di tipo 1 dovuta alla carenza di nutrienti dipende da fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) per la formazione di autofagosomi ma indipendente dalle proteine mitofagiche PINK1 e Parkin. La formazione mediata da PI3K di domini di membrana ricchi di fosfatidil inositolo trifosfato (PIP3) è

importante per la nucleazione della membrana di isolamento. Mentre la mitofagia di tipo 2 che si verifica a causa di danni dipende da PINK1 e Parkin ma non da PI3K.

I lisosomi sono i principali organelli degradativi (Bajaj L., et al., 2019), sono ubiquitari e racchiusi da membrana. Sono organelli altamente dinamici, regolati trascrizionalmente. Inoltre, i lisosomi sono strutture cataboliche, piene di enzimi idrolitici (idrolasi acide) che digeriscono un ampio spettro di substrati, sia i materiali extra- che intracellulari generati da endocitosi, fagocitosi e autofagia (Medina DL., et al., 2015; Yin Q., et al., 2020) e sono il sito principale nella cellula che svolge un ruolo chiave nell'omeostasi cellulare controllando anche il rilevamento dei nutrienti e del riciclo metabolico. La membrana lisosomiale ospita molti complessi proteici multimerici coinvolti nel trasporto di metaboliti dentro e fuori dal lisosoma, nell'acidificazione del lume, nel traffico e nella fusione con altre strutture intracellulari. Le proteine di membrana dei lisosomi sono glicosilate e quindi protette dalle proteasi lisosomiali che sono presenti all'interno del lisosoma. Le proteine del trasporto nella membrana lisosomiale sono multimeriche, portano i prodotti della digestione nel citoplasma (Tol M.J., et al., 2018). Questi prodotti sotto forma di aminoacidi, zuccheri o nucleotidi possono essere secreti fuori dalla cellula oppure riutilizzati. Questo processo di riciclaggio fornisce anche energia per la cellula. Hanno ruoli importanti in molti processi fisiologici come la risposta immunitaria, la riparazione della membrana plasmatica, il riassorbimento osseo e la morte cellulare.

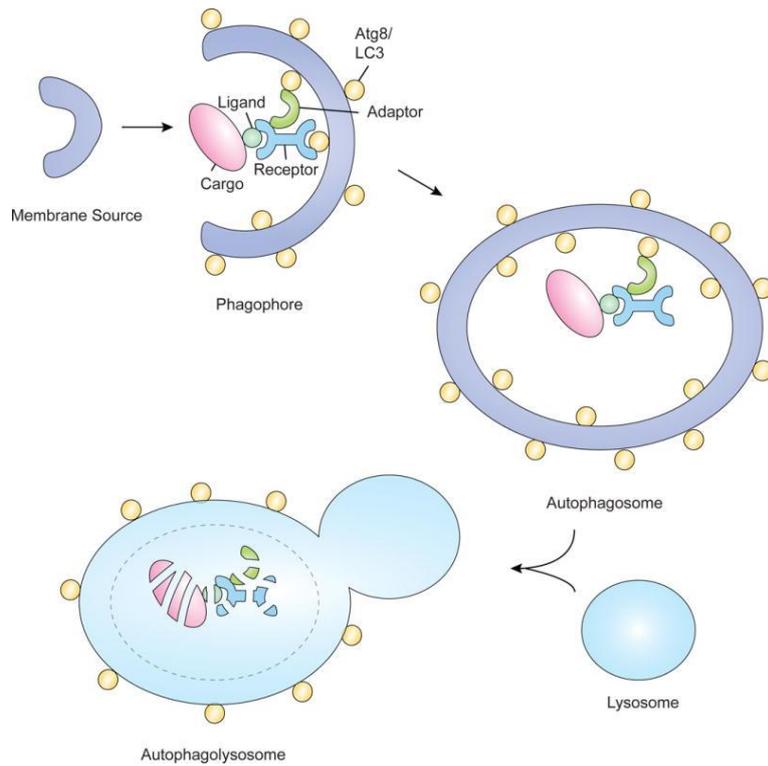


Figura 2: Figura Autofagia

selettiva

Nell'autofagia selettiva gli organelli sono degradati dall'autofagolisosoma. Gli organelli sono segnati attraverso l'ubiquitinazione per la distruzione. Le proteine di riconoscimento rilevano il carico e lo portano attraverso l'interazione diretta o indiretta con le proteine ATG come ATG8/LC3, alla doppia membrana autofagosomica in formazione, nota come fagoforo. Dopo che il bersaglio è stato portato al fagoforo, si verifica la formazione dell'autofagosoma e questa struttura possa alla fine si fonde con il lisosoma per formare l'autofagolisosoma, che effettua la degradazione dei substrati tramite le idrolasi acide presenti nei lisosomi.

Anding AL., et Baehrecke EH., 2017

Ruolo fisiopatologico della mitofagia

L'interazione principale e più diretta tra mitocondri e lisosomi è costituita dalla mitofagia, un meccanismo selettivo di autofagia (Pickles S., et al., 2018) mirato all'eliminazione degli organelli mitocondriali disfunzionali o danneggiati dal citoplasma (Shefa U., et al., 2019). La loro sostituzione con mitocondri neo-formati è un processo di grande rilevanza fisiopatologica. La mitofagia serve per aiutare a mantenere l'omeostasi. Questo processo altamente regolato è integrato con altri sistemi di controllo della qualità mitocondriale che includono la dinamica degli organelli e lo smaltimento di singole proteine mitocondriali e complessi proteici. Lo scopo primario della mitofagia è il mantenimento della qualità (Pickles S., et al., 2018) e della quantità dei mitocondri, sia in condizioni basali che di stress. La degradazione dei mitocondri da parte della mitofagia è particolarmente importante nel metabolismo cellulare in cui i mitocondri svolgono un ruolo essenziale. Ad esempio, l'eliminazione dei mitocondri degradati ed obsoleti è un processo essenziale per la sopravvivenza dei neuroni. Una mitofagia alterata porta all'accumulo di mtDNA danneggiato all'interno di mitocondri scarsamente funzionali/danneggiati, con una ridotta capacità di sintetizzare l'ATP, che producono alti livelli di anione superossido (Anding AL., et Baehrecke EH., 2017; Narendra ., et al., 2008). Il danno ossidativo può anche saturare la mitofagia e causare il rilascio di mtDNA ossidato verso il citosol o il compartimento extracellulare. Mitocondri disfunzionali sono presenti nelle malattie metaboliche e neurodegenerative. Tuttavia, le cellule che devono soddisfare la maggior parte del loro fabbisogno energetico e che dipendono dalla catena del trasporto degli elettroni, come i neuroni, i miociti e i cardiomiociti, non sono in grado di tollerare la rimozione di considerevoli porzioni della loro rete mitocondriale, come mezzo per proteggersi dallo stress ossidativo. E' interessante notare che la mitofagia richiede che la funzione di Atg5 sia intatta e sembra essere indipendente dalla segnalazione di mTORC1 (Nezich CL., et al., 2015). Parkin e la proteina ubiquitina ligasi 1 mitocondriale E3 (MUL1) sono inoltre necessarie per la degradazione dei mitocondri paterni dopo la fecondazione nei topi (Rojansky et al., 2016). La mitofagia PINK1-dipendente influenza la pluripotenza e lo stato di differenziazione nelle cellule staminali. Il lavoro pionieristico di Narendra et al., 2008, ha dimostrato che parkin può svolgere un ruolo fondamentale nella mitofagia nelle cellule di mammifero. E hanno scoperto che la posizione intracellulare di parkin è regolata dalla funzione mitocondriale. La mitofagia mediata da PINK1/Parkin inibisce l'accumulo di prodotti mitocondriali tossici e impedisce ai mitocondri danneggiati di fondersi con la rete sana. Per essere compreso il meccanismo molecolare della mitofagia PINK/Parkin- dipendente sono stati ampiamente utilizzati agenti depolarizzanti per interrompere il potenziale di membrana dei mitocondri e indurre la mitofagia, in vitro. Molti studi hanno indagato la mitofagia nei mammiferi, stimolando lo stress mitocondriale con sostanze chimiche o veleni mitocondriali, quali inibitori respiratori o disaccoppianti (protonofori) che dissipano il potenziale della membrana, o inducono sovrapproduzione di specie reattive dell'ossigeno mitocondriale (mtROS) o proteotossicità e anche sovraesprimendo PINK1 e PRKN nelle linee cellulari tumorali. E' stato dimostrato che nelle cellule dei mammiferi l'induzione della mitofagia mediante l'uso di CCCP causa depolarizzazione dei mitocondri. I mitocondri depolarizzati hanno difficoltà ad importare

proteine mitocondriali non piegate, codificate dal nucleo che sono utilizzate da PINK1 per la localizzazione sulla superficie dei mitocondri come segnale di rimozione di mitocondri difettosi (Killackey, S.A., et al., 2020). La conseguenza è la stabilizzazione di PINK1 sulla membrana mitocondriale esterna. Malgrado il significativo contributo alla delucidazione della mitofagia, con l'uso di agenti protonofori come i disaccoppianti chimici CCCP e FCCP (ionofori non specifici) e gli inibitori di OXPHOS, come valinomicina e oligomicina (ionofori) e antimicina A (inibitore del complesso III), le condizioni che creano sono diverse dalle condizioni fisiologiche e quelle fisiopatologiche. L'oligomicina e l'antimicina A inducono il reclutamento di Parkina. Parkin normalmente risiede nel citosol ma trasloca nei mitocondri depolarizzati dopo il trattamento con CCCP che induce la clearance autofagica dei mitocondri dei mammiferi, senza provocare l'autofagia di altri organelli cellulari (Ashrafi, G., et Schwarz, T.L., 2013). La mitofagia svolge un ruolo rilevante nello sviluppo normale, come recentemente analizzato e quantificato in vitro e in vivo in modelli murini transgenici fluorescenti (come mt-Keima o mito-QC) (Padman B. S., et al., 2019; Doblado L., et al., 2021). Tuttavia, più in generale, questo meccanismo biologico fondamentale agisce in tutte le cellule o tessuti, essendo regolato in risposta alle loro variabili esigenze energetiche. La mitofagia ha un ruolo molto importante nelle cellule differenziate e che dipendono molto dal metabolismo aerobico, come miociti, epatociti e neuroni e quindi alcuni tessuti, come il sistema nervoso, il rene, il muscolo scheletrico, il cuore e il fegato, mostrano un'elevata attività mitofagica basale, mentre altri, come la milza e il timo, mostrano bassi livelli di mitofagia (Doblado L., et al., 2021).

È interessante notare che, sebbene PINK1 e Parkin siano importanti per il turnover basale delle proteine mitocondriali, moscerini e topi knockout PINK1 e Parkin non mostrano alcun difetto nella mitofagia basale, che è particolarmente elevata nei tessuti metabolicamente attivi come il cuore e il muscolo ([Vincow et al., 2013](#); [McWilliams et al., 2018b](#); [Lee et al., 2018](#)).

I topi privi di PINK1 o Parkin non sviluppano spontaneamente un fenotipo e i livelli di mitofagia basale in tessuti metabolicamente attivi come il cuore e il cervello non sono influenzati dalla perdita di nessuna di queste proteine ([McWilliams et al., 2018b](#)). Allo stesso modo, le piastrine di topi carenti di PINK1 funzionano normalmente e non mostrano alcun difetto nella mitofagia basale ([Walsh et al., 2018](#)).

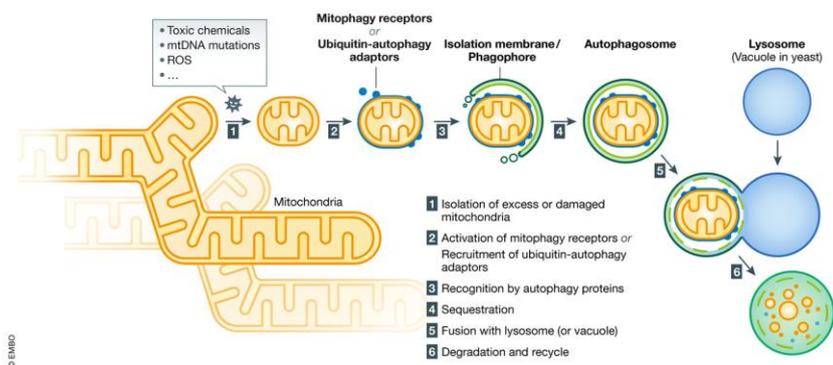


Figura 3: Figura

Mitofagia

La mitofagia può essere innescata da vari stimoli, come ipossia, l'utilizzo di disaccoppiatori o ROS, che possono causare danni ai mitocondri. Nei mammiferi PINK1 fosforila vari bersagli tra cui l'ubiquitina, il Parkin viene reclutato e amplifica il segnale mediante ubiquitinazione di altre proteine associate alla superficie mitocondriale. Così si promuove il reclutamento dei recettori mitofagici che legano l'ubiquitina. Le proteine recettoriali (come ATG5) reclutano i mitocondri nell'autofagosoma formante, per la degradazione e facilitano l'interazione con la membrana dell'autofagosoma.

La via di PINK1/ Parkin

La ben nota via canonica della mitofagia è mediata da due proteine principali, Parkin e PINK1. Parkin, una E3-ubiquitina ligasi citosolica, e PINK1, che codifica per una serina/treonina-protein chinasi con una sequenza di localizzazione mitocondriale, sono geneticamente legati e costituiscono l'asse della mitofagia ubiquitina-dipendente e regolano la funzione dei mitocondri (Heidi-Martini S., et al., 2016). PINK1 è codificata da un gene nucleare ed è sintetizzata nel citoplasma. In condizioni fisiologiche, cioè quando i mitocondri funzionano normalmente, la membrana mitocondriale interna possiede un potenziale transmembrana determinato dall'estrusione di protoni da parte dei complessi della catena respiratoria I, III e IV. Tale potenziale di membrana è essenziale per la sintesi di ATP e per l'ingresso di precursori di proteine mitocondriali e di metaboliti. L'importo di PINK1 è altamente sensibile ai cambiamenti di potenziale di membrana. In particolare, PINK1 si accumula sui mitocondri difettosi e segnala gli organelli alla degradazione selettiva. PINK1 viene normalmente importato nei mitocondri nell'IMM, membrana mitocondriale interna attraverso le translocasi delle membrane mitocondriali esterne ed interne TOMM e TIMM23, dove viene degradato proteoliticamente dalle peptidasi della matrice mitocondriale (MPP) (Yamano, K., et Youle., R.J., 2013; Doblado L., et al., 2021). Dopo la traslocazione e l'inserimento di PINK1 nella membrana interna mitocondriale, si verifica anche la scissione di PINK1 all'interno nel suo dominio idrofobico transmembrana, operata dalla proteina PARL, associata alla presenilina, una proteasi nella membrana interna mitocondriale, portando a una forma matura di PINK1 da 52 kD. PARL rilascia quindi questa forma troncata di PINK1 nel citosol, dove viene velocemente degradata proteoliticamente dalle ligasi dell'ubiquitina E3 di tipo N-degron-2 ed è degradata dal sistema del proteasoma dell'ubiquitina (UPS) durante il normale potenziale della membrana. Questo continuo ciclo di importazione e degradazione di PINK1 mantiene i suoi livelli molto bassi nei mitocondri sani (Aerts, A., et al., 2015).

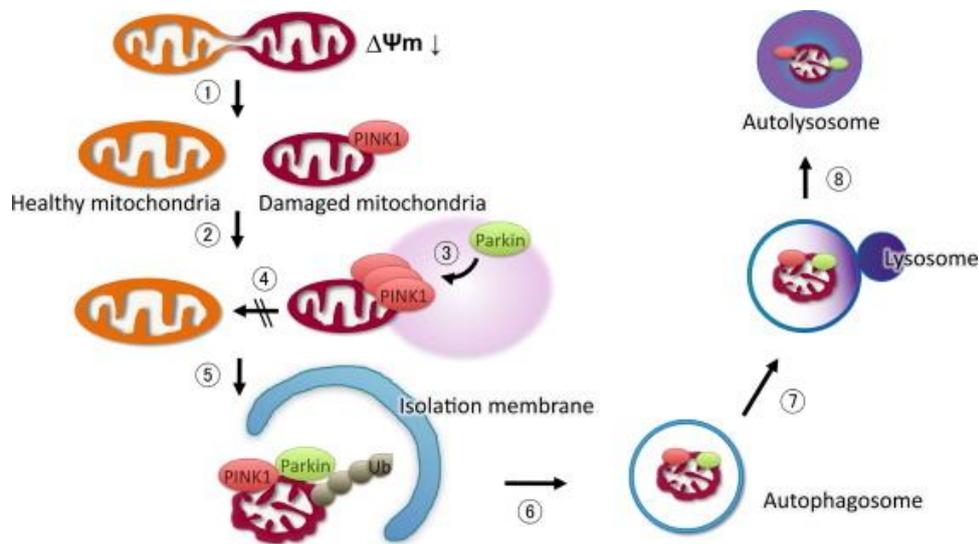


Figura 4: Figura

Il percorso PINK/Parkin della mitofagia

Nei mitocondri sani PINK1 è importata nella membrana mitocondriale interna attraverso il complesso TOM/TIM. La perdita di potenziale di membrana nei mitocondri danneggiati impedisce l'importazione di PINK, portando al suo accumulo non trasformato sulla superficie esterna della membrana dove si associa al complesso TOM e recluta l'ubiquitina ligasi E3 Parkin citosolica nei mitocondri danneggiati e depolarizzati. La parkina dopo che è stata attivata produce altre catene di ubiquitina nei mitocondri, che a loro volta subiscono la fosforilazione da parte di PINK1, promuovendo il reclutamento di più parkin. La frammentazione mitocondriale e la perdita del potenziale promuovono la formazione autofagosomica intorno ai mitocondri danneggiati ed ubiquitinati e la loro eliminazione autofagica.

La mitofagia è attivata dalla depolarizzazione della membrana mitocondriale interna. Nei mitocondri danneggiati, il processo di OXPHOS è spesso alterato portando a difetti nel potenziale della membrana mitocondriale e alla depolarizzazione dell'IMM, non si può mantenere il gradiente e perciò l'ingresso delle proteine è bloccato. L'importazione mitocondriale, attraverso il complesso TIMM, è influenzata non solo dalla depolarizzazione della membrana mitocondriale, ma anche dall'inibizione della catena di trasporto degli elettroni, dalla mancanza di NADH, dalla presenza di complessi respiratori disfunzionali, da fattori di stress genetici o ambientali, come disfunzione mitocondriale causata da ipossia e l'infiammazione, e dall'accumulo di proteine mal ripiegate nella matrice mitocondriale o altri stress come aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) mitocondriale (Nunnari J., et Suomalainen A., 2012 ; Frazier AE., et al., 2017). In tali condizioni avverse, viene ridotto significativamente il processamento di PINK1 da parte di PARL che viene così stabilizzata e si accumula sulla membrana mitocondriale esterna (OMM), attraverso il legame alla translocasi al complesso TOMM e dove recluta Parkin (Hamacher-Brady A., et Brady RB., 2016), innescando la sua attività di ubiquitinazione delle proteine mitocondriali (Herst PM., et al., 2017). Sulla membrana mitocondriale esterna, Parkin e ubiquitina sono fosforilati e attivati da PINK1 sui residui della Ser228 e Ser402 (Aerts L, et al,2015). Durante la mitofagia PINK1 fosforila sia l'ubiquitina che la Parkin a Ser65 per reclutare dal citoplasma e attivare sulla membrana mitocondriale esterna (Padman B. S., et al., 2019) e l'attività dell'ubiquitina ligasi di Parkin sui mitocondri danneggiati e destinati alla degradazione che si raggruppano sopra il nucleo (Narendra D., et al., 2008). La parkina è una E3-ubiquitina ligasi citosolica che, quando viene reclutata, fosforilata ed attivata in mitocondri depolarizzati, agisce come amplificatore del segnale mitofagico generato da PINK1, e guida la poliubiquitinazione di un insieme di diverse proteine alla superficie mitocondriale esterna (Nguyen et al., 2016), tra cui la proteina del canale anionico VDAC1, e le mitofusine 1 e 2 (MFN1 e 2) (Narendra D., et al., 2008). La degradazione della mitofusina previene la fusione dei mitocondri danneggiati per la successiva degradazione da parte della mitofagia. Durante l'ubiquitinazione interi mitocondri danneggiati o non necessari sono selettivamente marcati e vengono quindi inghiottiti dagli autofagosomi che vengono trasportati lungo i microtubuli per fondersi con i lisosomi per la degradazione (Ivankovic D., et al., 2016; Anding AL., et Baehrecke EH., 2017.). La fusione tra autofagosomi e lisosomi porta alla formazione di autolisosomi, nell'interno dei quali i mitocondri difettivi vengono inghiottiti e successivamente sottoposti alla degradazione (Martini-Stoika, H., et al., 2016; Yoo S-M., et Jung Y-K., 2018). Le proteine mitocondriali ubiquitinate facilitano il legame diretto dei mitocondri con LC3-II che è incorporata nella membrana del fagoforo consentendo il loro inghiottimento da parte degli autofagosomi. LC3-II è necessario per l'allungamento e la chiusura della membrana per formare autofagosomi maturi. Parkin consente anche il reclutamento di adattatori mitofagici che aiutano a assemblare la formazione dell'autofagosoma attorno all'organello prima della successiva fusione con un autolisosoma. Questo processo è mediato possibilmente dall'accumulo della proteina adattatrice di legame dell'ubiquitina p62/sequestosoma-1(SQSTM1) sui mitocondri destinati allo smaltimento e dal suo legame con LC3-II. La poliubiquitinazione dei substrati fosforilati di Parkin, porta alla loro degradazione attraverso il proteasoma e a loro volta fungono da bersagli di fosforilazioni aggiuntive per PINK1 creando un ciclo in cui vengono degradate dal proteasoma e attivano la loro interazione con le proteine adattatrici (LC3) della mitofagia che legano l'ubiquitina, tra cui sequestosoma-1 (p62), l'optineurina (OPTN), la proteina 52 del punto nucleare 10 (NDP52) e la proteina 1A/1B-catena leggera 3 (LC3) della proteina 1A/1B associata ai microtubuli (Garza-Lombo C., et al., 2020; Belousov DM., et al., 2021). Ciò porta a un riconoscimento dell'organello mitocondriale marcato con l'ubiquitina da parte dei cinque recettori cargo LC3

mitocondriali, che avviano la loro degradazione da parte del macchinario dell'autofagia (Lazarou M., et al., 2015). I recettori optineurina (OPTN) e la proteina NDP52 mediano la mitofagia PINK dipendente (Padman BS., et al., 2019; Doblado L., et al., 2021).

La famiglia della microftalmia dei fattori di trascrizione MiT/TFE

I fattori di trascrizione della microoftalmia (MiT/TFE) appartengono alla superfamiglia delle proteine contenenti domini leucine zipper (bHLH-Zip) basici che include regolatori della trascrizione, come Myc, Max (Yang M., et al., 2018), proteina legante gli elementi regolatori degli steroli (SREBP). Nei vertebrati, la famiglia MiT/TFE è composta da quattro membri evolutivamente conservati e strettamente correlati: fattore di trascrizione associato alla microoftalmia (MITF), fattore di trascrizione EB (TFEB), TFE3 e TFEC (Napolitano, G., et al., 2016). I membri di questa famiglia di fattori di trascrizione condividono strutture proteiche simili, riconoscono e legano attraverso il dominio di base alle regioni regolatrici dei loro geni bersaglio di DNA che contengono un motivo CANNTG palindromico a 6 coppie di basi, chiamato E-box. È stato dimostrato che i fattori di trascrizione della famiglia MiTF/TFE formano, in vitro, sia omodimeri che eterodimeri con qualsiasi altro membro della famiglia e la forma dimerica è fondamentale per il legame al DNA e l'attivazione trascrizionale dei geni bersaglio simili (Yang M., et al., 2018). Tutti i membri della famiglia MiT/TFE condividono elevate somiglianze di sequenza dei domini funzionali elicoidali e di leucina identici, altamente conservati tra specie diverse, compresi quelli richiesti per il legame del DNA e l'omo/eterodimerizzazione. Questi domini sono detti di transattivazione. Una somiglianza significativa si osserva anche all'interno delle loro regioni N- e C-terminali che svolgono un ruolo importante nella regolazione della localizzazione e della stabilità delle proteine. I domini helix-loop-helix basica e Leucina zipper sono usati per le interazioni di proteine tra di loro.

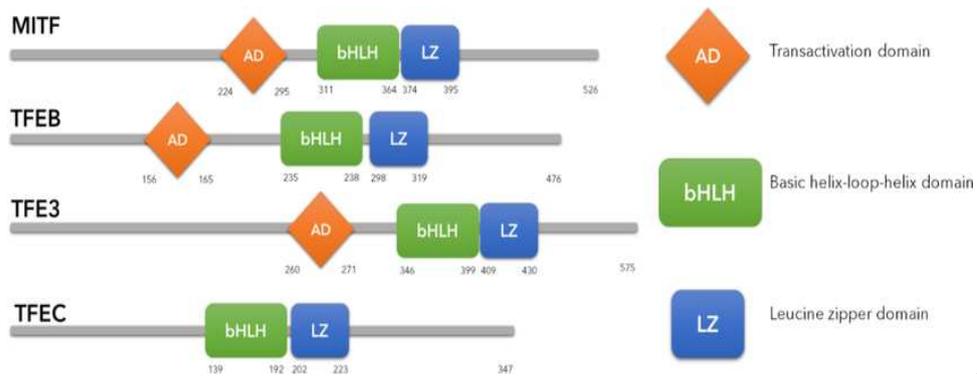


Figura 5: Figura

I membri della famiglia delle proteine MiT/TFE

I vari domini trovati in MITF, TFEB, TFE3 e TFEC

AD: dominio acido

bHLH: elica di base

LZ: dominio cerniera leucina

I tessuti di espressione di TFEB corrispondono a TFE3, mentre differiscono molto da MITF e TFEC. Il fattore di trascrizione EB è un fattore di trascrizione con bassa specificità tissutale e cellulare che è ampiamente espresso nei feti e negli adulti (Napolitano G., et al., 2016). TFEB e TFE3 sono stati collegati con tumorigenesi (Napolitano G., et al., 2016). TFEB è clinicamente rilevante principalmente come oncogene sporadicamente mutato nei reni e nei polmoni, dove è frequentemente coinvolto in una traslocazione cromosomica con il gene Alpha non trascritto (MALAT1), che fornisce un promotore costitutivamente attivo a monte del gene TFEB che guida la sua trascrizione (Yang M., et al., 2018). Una maggiore espressione di TFEB si trova nei pazienti con glioblastoma e contribuisce alla resistenza del glioblastoma alla chemioterapia. A differenza di TFEB e TFE3, MITF è espresso prevalentemente in melanociti, osteoclasti, mastociti, macrofagi, cellule Natural Killer, linfociti B e nei cardiomiociti. L'espressione di TFEC è molto più ristretta, prevalentemente nelle cellule mieloidi (Yang M., et al., 2018). L'alto grado di omologia tra i quattro membri della famiglia dei mammiferi MiTF/TFE suggerisce che potrebbero condividere meccanismi di regolamento comuni. Studi recenti hanno dimostrato che TFE3 e MITF sono anche regolati da mTORC1 e promuovono la trascrizione di reti geniche simili a quelle regolate da TFEB (Nezich C L., et al., 2015 ; Martina J A., et al., 2014)². Tra tutti i membri della famiglia MiTF/TFE, TFEB è il più noto e studiato e la maggior parte della letteratura disponibile lo riguarda e negli ultimi decenni la sua funzione è stata meglio precisata perché è considerato il principale regolatore dell'autofagia e della biogenesi lisosomiale.

²Per il ruolo di TFEB e TFE3 la recensione di Brady, O., A., et al., 2018 Emerging roles for TFEB in the immune response and inflammation

Come è regolata l'(in)attività di TFEB?

L'analisi dei promotori di molti geni lisosomiali ha rivelato la presenza di un motivo palindromico a 10 basi (5'-GTCACGTGAC-3') situato nelle 200 paia di basi dal sito di inizio della trascrizione (Yang M., et al., 2018). Questa sequenza viene definita elemento CLEAR (espressione e regolazione coordinata) (Sardiello M., et al., 2009). TFEB controlla l'espressione dei suoi geni bersaglio della via autofagia-biogenesi lisosomiale attraverso il legame alla sequenza CLEAR (Palmieri M., et al., 2011). TFEB è attivato in risposta a condizioni di mancanza di nutrienti, stress del reticolo endoplasmatico, infezioni da agenti patogeni, infiammazione, danno ai mitocondri (Martina JA., et al., 2014; Settembre C., et al., 2012; Palmieri M., et al., 2011;). In forma inattiva TFEB è fosforilato e localizzato nel citoplasma e la sua attivazione avviene attraverso la defosforilazione che permette la migrazione nel nucleo dove svolge la sua azione di fattore trascrizionale. La traslocazione di TFEB nel nucleo è mediata dal sistema di mantenimento cromosomico 1 (CRM1/Exportin-1) (Klionsky D J., et al., 2021 ; Napolitano G., et al., 2018).

L'espressione del TFEB in cellule promuove l'espressione genica delle proteine lisosomiali, l'attività catabolica lisosomiale attraverso l'aumento del numero e dell'attività dei lisosomi, e facilitando l'aumento della clearance dei substrati lisosomiali (Palmieri M., et al., 2011), come i glucosaminoglicani, come eparan solfato e cheratan solfato e di sfingolipidi. Inoltre, il promotore di TFEB contiene più sequenze CLEAR. Pertanto, TFEB sovraregola la sua stessa espressione in un ciclo autoregolatorio indotto dalla mancanza di nutrienti (Martini-Stoika H., et al., 2016; Xu,J.,et al., 2020 ;Settembre C., et Ballabio A., 2011). TFEB controlla i geni che codificano le subunità della pompa protonica vacuolare (v-ATPasi), che crea e mantiene l'ambiente acido nei lisosomi necessario agli enzimi idrolasi nei lisosomi di esercitare le loro attività idrolitiche. Inoltre, è stato dimostrato che TFEB controlla la biogenesi mitocondriale (Mansueto G., et al., 2018). Una peculiarità di TFEB è che regola anche le vie degradative non lisosomiali. Per esempio, TFEB controlla due reazioni consecutive nella degradazione dell'emoglobina, che non avviene nel lisosoma (Settembre C., et al., 2012 ; Palmieri M., et al., 2011).

Regolazione dell'attività di TFEB nella segnalazione mTORC

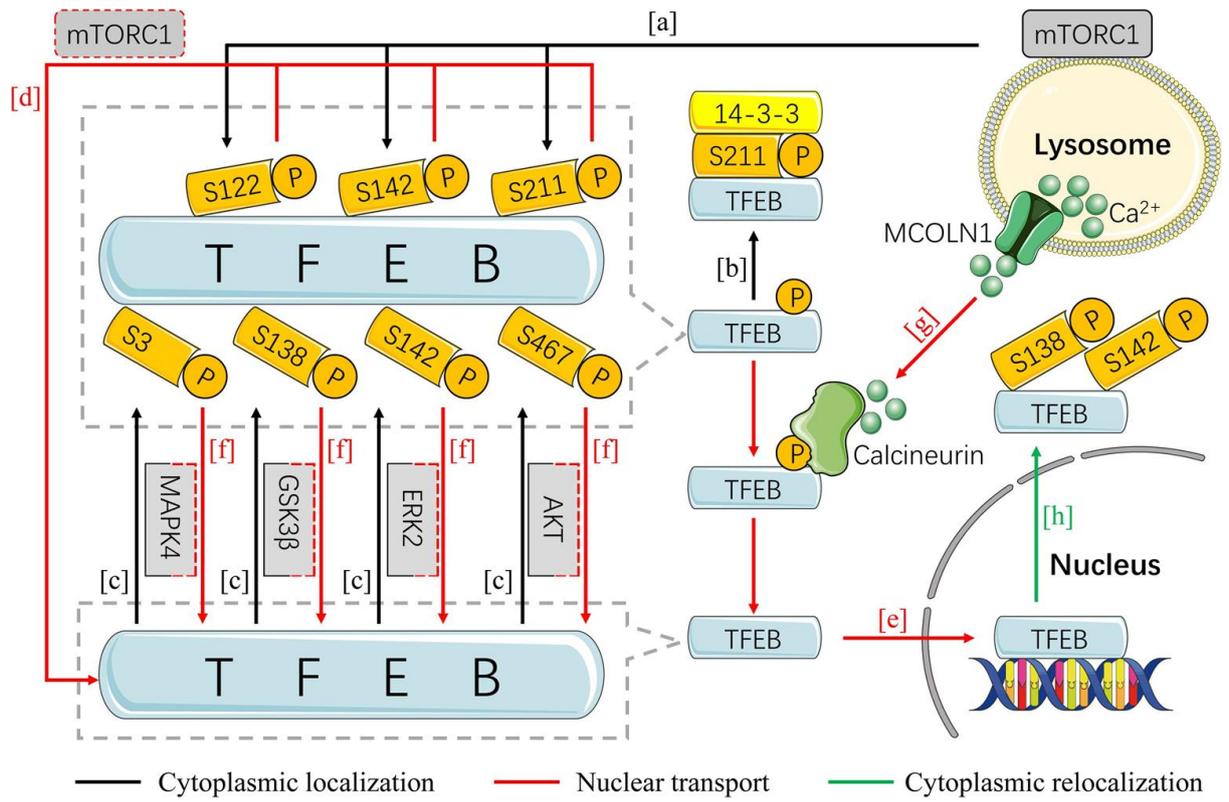
L'attività del TFEB è strettamente controllata da modifiche post- traduzionali, che regolano le sue interazioni con altre proteine e la sua localizzazione cellulare (Napolitano G., et Ballabio A., 2016). Attualmente si ritiene che la fosforilazione è il principale fattore che controlla l'attività TFEB. La proteina più importante coinvolta nel processo della regolazione di TFEB è mTORC1 (bersaglio/target meccanicistico della rapamicina), un importante complesso chinasi che regola positivamente la crescita cellulare e negativamente l'autofagia. mTORC1 fosforila TFEB a livello delle serine 122, 142 e 211. La fosforilazione della serina 142 è necessaria per la ritenzione citosolica di TFEB (Settembre C., et al., 2011). Le mutazioni di queste serine (Ser142, Ser138 o Ser211) in alanine determinano un aumento significativo della localizzazione nucleare del TFEB costitutiva e della sua attività (Settembre C., et al., 2011 ; Settembre C., et al., 2012 ; Palmieri M., et al., 2017 ; Paquette M., et al., 2021; Li M., et al., 2021). In condizioni di normale disponibilità di nutrienti, la GTPasi Rag, un sensore dei livelli di amminoacidi, promuove l'interazione e la fosforilazione TFEB da parte di mTORC1 (Lawrence RE., et al., 2018; Napolitano G., et Ballabio A., 2016; Roczniak-Ferguson A., et al., 2012; Settembre C., et al., 2012). TFEB fosforilato (a livello della Ser211) interagisce con lo chaperone 14-3-3, e viene sequestrato nel citoplasma in forma inattiva (Roczniak-Ferguson A., et al., 2012; Martini-Stoika H., et al., 2016). Al contrario, la carenza di nutrienti si traduce in una ridotta disponibilità di amminoacidi inattivano Rag GTPasi, consentendo la defosforilazione di TFEB, e la sua dissociazione da 14-3-3 e la sua traslocazione nucleare (Vega-Rubin- de- Celis S., et al., 2017; Settembre C., et al., 2011)³. Inoltre, in condizioni di privazione di nutrienti, il rilascio localizzato di calcio dai lisosomi induce l'attivazione della calcineurina fosfatasi calcio-sensibile, che defosforila TFEB, promuovendone così la traslocazione nucleare (Medina DL., et al., 2015). TFEB è anche coinvolto nella regolazione del catabolismo lipidico (Settembre C., et al., 2013), attraverso una transattivazione indotta dalla fame di PPAR α e PPAR α co-attivatore 1 α (PGC1 α), che sono due regolatori chiave del metabolismo lipidico durante la fame mediata da TFEB.

³Descritto nella recensione di Brady, O., A., et al., 2018 Emerging roles for TFEB in the immune response and inflammation

Ruolo di altre proteine chinasi nella regolazione di TFEB

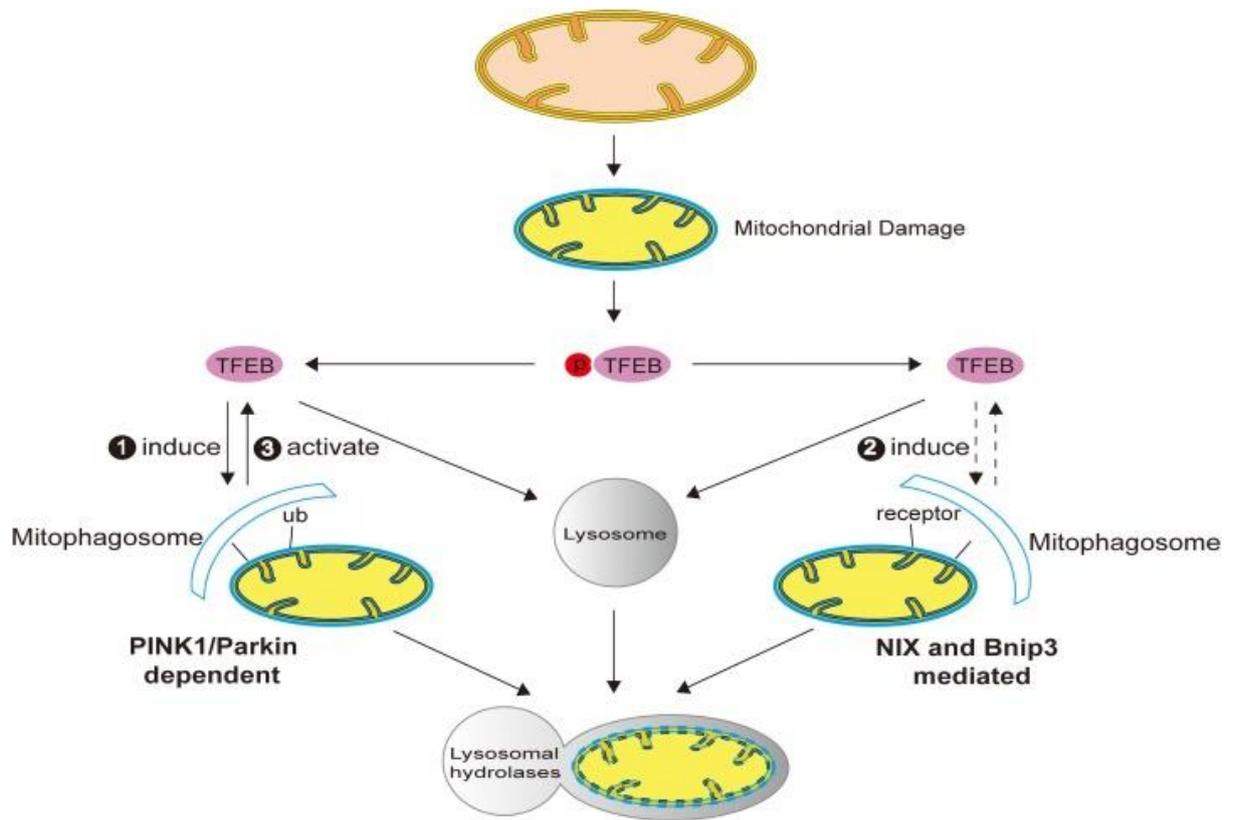
TFEB è il substrato di molte altre serina/treonina proteine chinasi, come la protein chinasi 1 attivata dal mitogeno (MAPK1), la protein chinasi chinasi chinasi 3 attivata dal mitogeno (MAP4K3), la glicogeno sintasi chinasi (GSK) 3 β , la chinasi extracellulare regolata dal segnale (ERK)2, Akt, nota anche come protein chinasi B (PKB) (Settembre C., et al., 2011 ; Li et al., 2016 ; Palmieri M., et al., 2017 ; Hsu et al., 2018; Bajaj L., et al., 2019), la protein chinasi C β (PKC β) (Ferron M., et al., 2013) e la Src chinasi (Contreras PS., et al., 2020). Tutte queste chinasi fosforilano TFEB a livello di vari residui. Per esempio, in condizioni di abbondanza di amminoacidi, MAP4K3 fosforila TFEB su Serina 3 e questo evento di fosforilazione è necessario affinché mTORC1 fosforili TFEB sul residuo di Ser211 per assicurarne la completa inattivazione tramite sequestro citosolico con 14-3-3 (Hsu C., et al., 2018). Anche le isoforme attivate di PKC, principalmente PKC α , PKC β e PKC δ , stimolano la biogenesi dei lisosomi indipendentemente da mTORC1. Anche altre modifiche post-traduzionali come acetilazione, sumoilazione, ossidazione e ubiquitinazione (Miller A., et al., 2005 ; Puertollano R., et al., 2018 ; Zhang et al., 2018 ; Wang et al., 2019 ; Wang Y., et al., 2020) possono anche contribuire alla regolazione dell'attività del TFEB in risposta a stimoli diversi. In conclusione, in circostanze fisiologiche, l'attivazione post- traduzionale del fattore di trascrizione EB è strettamente regolata e collegata allo stato metabolico della cellula.

Inoltre, esiste una molteplicità di meccanismi molecolari che portano all'attivazione della famiglia MiT/TFE oltre alla regolazione dipendente da mTORC1. Questi includono l'attivazione della proteina calcineurina (serina/treonina fosfatasi calcio dipendente), la PP2A (Proteina Fosfatasi 2) che sono state descritte come fosfatasi MiT che reagiscono ai cambiamenti nei livelli intracellulari di Ca^{2+} e allo stress ossidativo acuto, rispettivamente, per defosforilare e attivare la proteina TFEB, e quindi autofagia e biogenesi lisosomiale e della chinasi del reticolo endoplasmatico simile a PKR (PERK)/splice X-box binding protein 1, proteina coinvolta rispettivamente nella risposta allo stress da accumulo di proteine (Medina DL., et al., 2015; Martina JA., et Puertolano R., 2018; Zhang et al., 2020 ; Hasegava J., et al., 2022). E' importante sottolineare che TFEB è anche indotto da disfunzione mitocondriale (Fernandez-Mosquera L., et al., 2017) ed è stato segnalato che regola la biogenesi mitocondriale indipendentemente da PGC-1 α , un coattivatore trascrizionale considerato il principale regolatore della biogenesi mitocondriale (Mansueto G., et al., 2017).



Stress mitocondriale

Nezich e colleghi (2015) hanno anche osservato una forte ridondanza tra TFEB e altri fattori di trascrizione della famiglia delle microftalmie, vale a dire MITF e TFE3. Fattori di stress come rotenone, CCCP o cloramina T possono innescare un rilascio mediato da MCOLN1 di Ca^{2+} dai lisosomi seguito dall'attivazione di calcineurina e TFEB. Queste vie di segnalazione non spiegano ancora in modo esaustivo l'effetto di TFEB sulla biogenesi mitocondriale. Ulteriori proteine autofagiche, come le idrolasi lisosomiali, sono anche indotte dal TFEB. TFEB coordina l'espressione di proteine lisosomiali e autofagiche a seguito di macroautofagia indotta da mancanza di nutrienti (Settembre C., et al., 2012). La mitofagia è coordinata da TFEB (Settembre C., et al., 2011), che trascrive i geni lisosomiali, insieme ad altri geni correlati all'autofagia coinvolti nella formazione dell'autofagosoma e nel riconoscimento del carico (Medina DL., et al., 2015).



Scopo della tesi

Lo scopo della tesi è di sviluppare dei modelli cellulari che possano essere utilizzati per degli screening di composti farmacologicamente attivi (ad esempio, le librerie di composti già approvati dalla FDA, l'agenzia del farmaco americana), in grado di (i) indurre la traslocazione e quindi l'attivazione di TFEB, e (ii) di indurre la mitofagia. E' importante sottolineare che i due processi sono correlati in quanto TFEB è un importante regolatore della auto/mitofagia.

Come linea cellulare abbiamo scelto i fibroblasti adulti di topo. Questo perché per le successive fasi di valutazione abbiamo a disposizione un topo knockout per COX15, una proteina mitocondriale a codificazione nucleare, coinvolta nella biogenesi della citocromo c ossidasi. Inoltre, abbiamo a disposizione un topo reporter per la mitofagia, che esprime MitoQC, una proteina di fusione costituita dalla sequenza di import mitocondriale di Fis1, una proteina coinvolta nei processi di fissione/fusione mitocondriale, e dal reporter GFP-mCherry (FIGURA). Inizialmente abbiamo prodotto dei costrutti over-esprimenti TFEB, fuso con la GFP o con un epitopo myc. Questo perché non esistono anticorpi funzionanti contro TFEB endogeno. Ho quindi inizialmente validato il sistema utilizzando composti noti in grado di attivare la mitofagia, in particolare la rapamicina, un inibitore di MTORC1, Torin1, un inibitore che blocca il legame dell'ATP a mTOR, e la curcumina C1, un putativo agonista di TFEB. I miei risultati dimostrano che il sistema che ho messo a punto ha un'elevata sensibilità nel detectare TFEB, la sua traslocazione nel nucleo. Inoltre, ho dimostrato che sfruttando il reporter MitoQC siamo in grado di osservare e quantificare i cambiamenti nella mitofagia indotti dai composti utilizzati.

Risultati

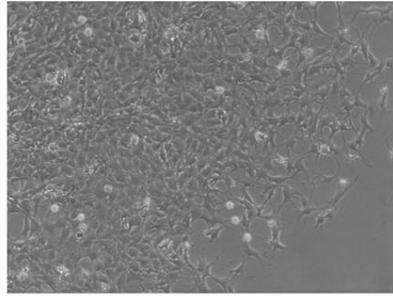
Creazione di una linea di fibroblasti immortalizzati esprimenti TFEB-GFP e TFEB-MYC

I fibroblasti primari adulti sono stati isolati da muscoli di topi wild-type e immortalizzati tramite trasfezione del plasmide SV40. Esperimenti preliminari di immunofluorescenza con anticorpo anti-TFEB non hanno permesso di valutare la traslocazione di TFEB nel nucleo a seguito di trattamento con induttori dell'autofagia; pertanto, si è reso necessario sovraesprimere TFEB per infezione lentivirale delle proteine taggate TFEB-GFP e TFEB-MYC. Le sequenze codificanti TFEB-GFP e TFEB-MYC sono state clonate nel vettore lentivirale pWPXLd-ires-PuroR e due linee di fibroblasti immortalizzati sono state infettate con i lentivirus prodotti a partire dai due vettori. Dopo l'infezione, le cellule sono state selezionate per la loro resistenza alla puromicina e in circa 10 giorni hanno formato delle colonie (figura in campo chiaro). A ulteriore conferma della corretta espressione del vettore lentivirale, i fibroblasti della linea sovraesprimente TFEB-GFP emettono un segnale citoplasmatico quando la GFP viene eccitata al microscopio a fluorescenza (figura).

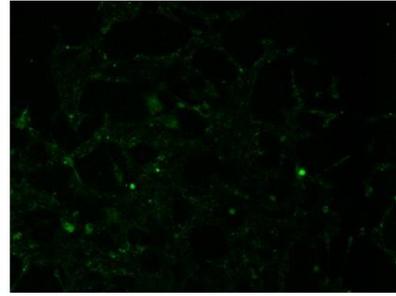
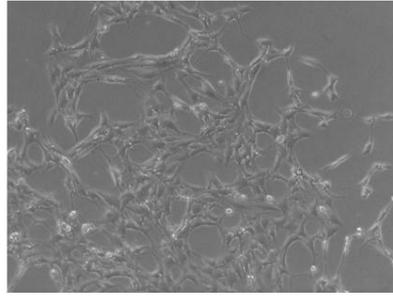
Brightfield

GFP

Fibroblasti immortalizzati
9 giorni dopo l'infezione con
pWPXLd-ires-PuroR TFEB-MYC



Fibroblasti immortalizzati
9 giorni dopo l'infezione con
pWPXLd-ires-PuroR TFEB-GFP



Traslocazione di TFEB con agonisti noti della mitofagia

Per verificare la sovraespressione e la traslocazione di TFEB nel nucleo, la linea di fibroblasti sovraesprimenti TFEB-GFP è stata trattata con Torin 1, un inibitore di mTOR, per 24 ore. Il segnale TFEB-GFP, localizzato nel nucleo nel controllo negativo trattato con DMSO, è invece presente nel nucleo a seguito di trattamento con Torin 1. Questo conferma che è possibile valutare la traslocazione di TFEB nel nucleo in questa linea cellulare.

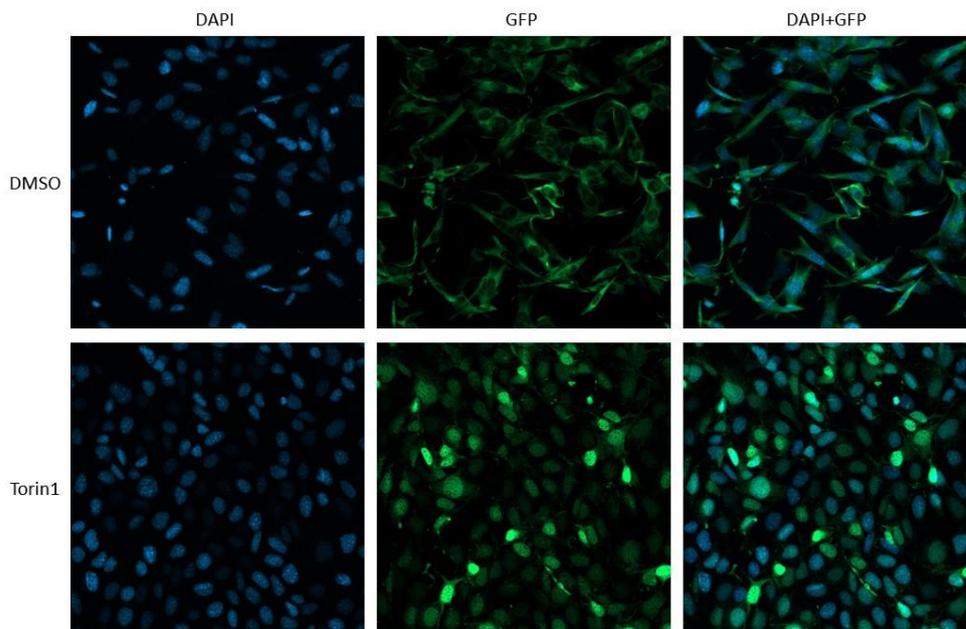
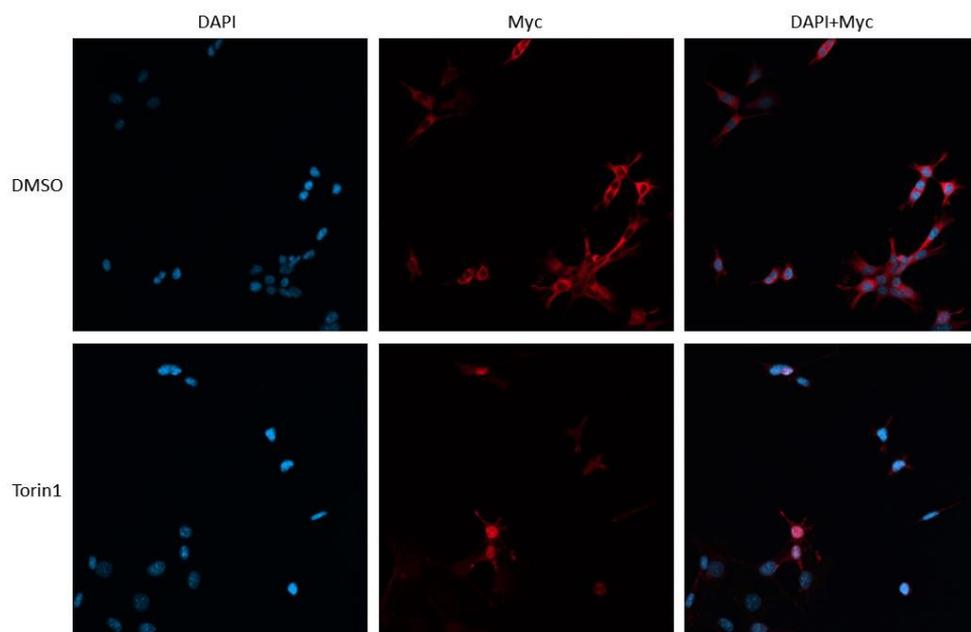


Figura 6: Figura

Immagini rappresentative di immunofluorescenza in fibroblasti primari ottenuti da topi adulti che esprimono il costrutto TFEB-GFP e quantificazione subcellulare di TFEB-GFP tag, trattati con il veicolo DMSO e Torin1. La fluorescenza è stata misurata a 485 nm per l'eccitazione e 520 nm per l'emissione. La presenza di TFEB (fluorescenza verde) nel nucleo delle cellule. Sono stati effettuati confronti nella stessa linea cellulare trattata con DMSO e con Torin1.

Lo stesso esperimento è stato ripetuto per la linea di fibroblasti esprimenti TFEB-MYC. In questo caso è stato possibile osservare per immunofluorescenza con anticorpo anti-MYC la traslocazione di TFEB-MYC nel nucleo a seguito del trattamento con Torin 1.



Le linee di fibroblasti sovraesprimenti TFEB-GFP (più facili da usare rispetto alle TFEBmyc) saranno utilizzate in uno screening di composti FDA-approved con l'obiettivo di identificare farmaci capaci di attivare la traslocazione nel nucleo di TFEB.

Effetti sulla mitofagia

Per lo studio della mitofagia è stata utilizzata una linea di fibroblasti immortalizzati wild-type esprimenti MitoQC, una proteina fluorescente composta da mCherry e GFP in fusione e da un segnale di targeting alla membrana esterna dei mitocondri. I fibroblasti sono stati trattati per 24 ore con tre noti induttori della mitofagia: Torin 1, rapamicina e l'analogo C1 della curcumina (Curcumina C1). Come controllo positivo sono stati usati FCCP e oligomicina. La figura mostra i risultati del trattamento: è possibile apprezzare il network mitocondriale (segnale GFP+mCherry).

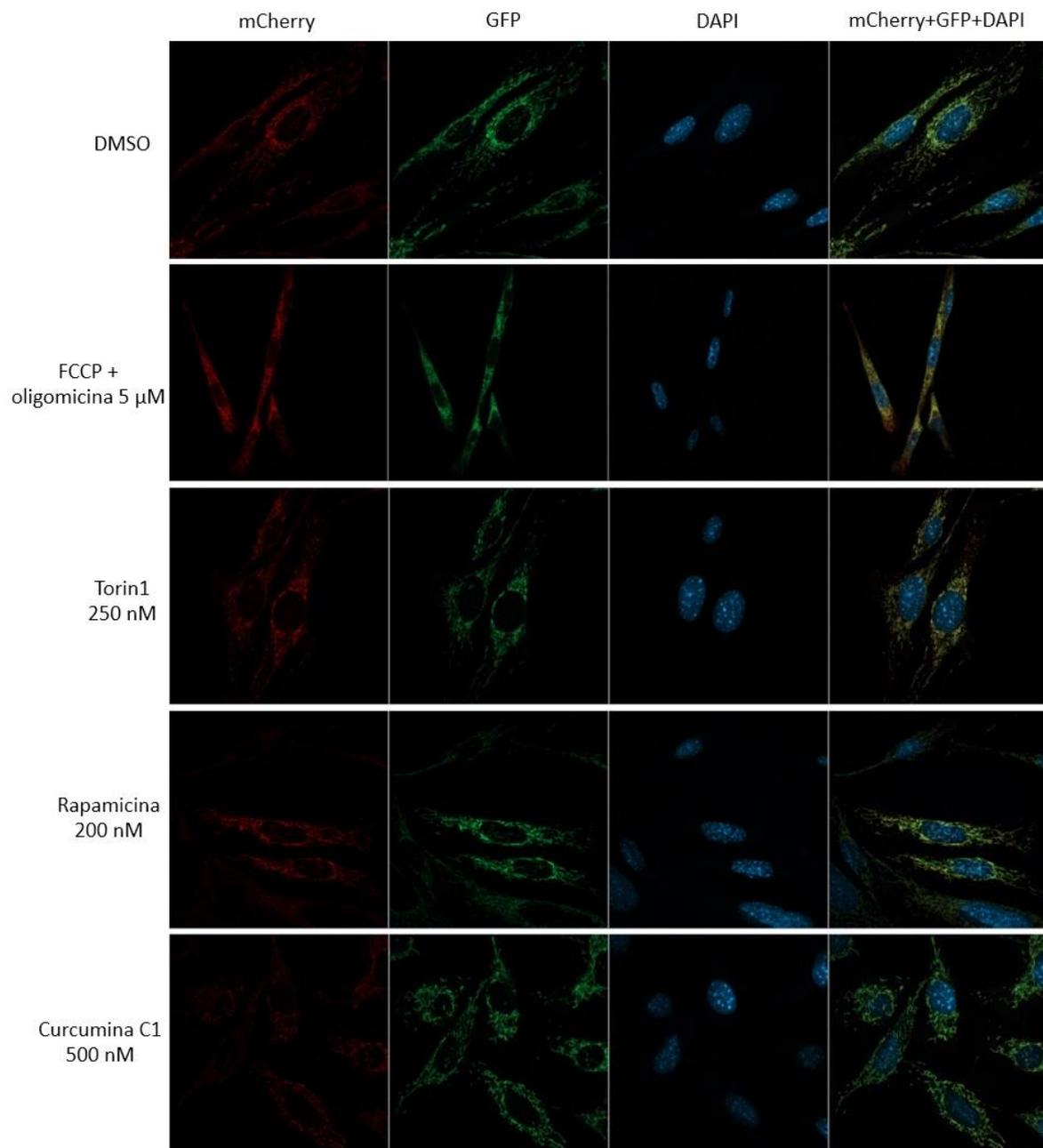


Figura 7: Microscopia a fluorescenza che esplora la mitofagia a seguito del trattamento farmacologico delle cellule fibroblastiche

I fibroblasti primari sono stati incubati per 24 ore con i farmaci indicati e poi sottoposti al fissaggio e la microscopia a immunofluorescenza. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI (colore blu).

I mitocondri in degradazione (mitolisosomi) appaiono invece come puntini rossi (solo mCherry è fluorescente in ambiente acido). Contando il numero di mitolisosomi, è possibile valutare se l'attivazione della mitofagia a seguito del trattamento. Il grafico mostra come Torin 1 e rapamicina causino un aumento significativo del numero di mitolisosomi per cellula, mentre la Curcumina C1 non ha causato attivazione della mitofagia alle concentrazioni testate.

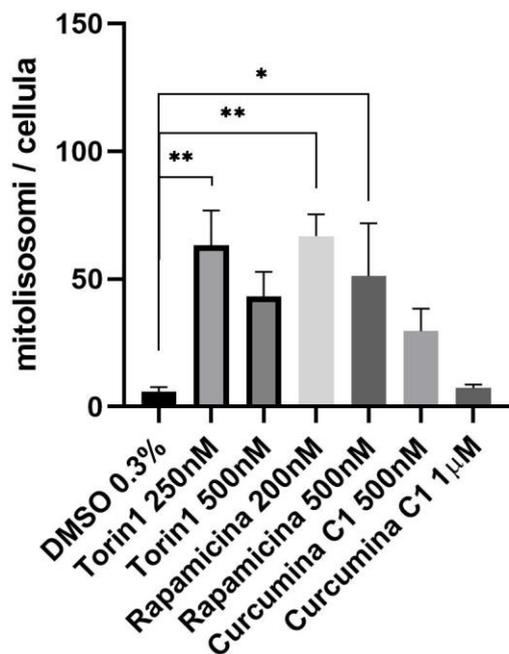


Figura 8: Figura

Le cellule sono state incubate con due diverse concentrazioni per 24 ore.

Discussione

Sulla base del ruolo di regolazione trascrizionale del fattore di trascrizione EB (TFEB) nell'autofagia e nel lisosoma, abbiamo caratterizzato la traslocazione nucleare indotta dal Torin 1 di TFEB.

TFEB è un attivatore trascrizionale dell'autofagia e la sua attivazione e la sua localizzazione subcellulare sono regolate principalmente attraverso gli eventi di fosforilazione /defosforilazione (Settembre C., et al., 2012; Zhitomirsky B., et al., 2018) che a sua volta la localizzazione subcellulare può essere rivelata attraverso esperimenti come l'immunofluorescenza. Normalmente, TFEB allo stato fisiologico è fosforilato direttamente da mTORC1 nel citoplasma ed è in forma inattiva (Raben N., et Puertollano R., 2016; Rogzniak-Ferguson A., et al., 2012 ; Settembre C., et al., 2011), ma quando l'attività di mTORC1 è inibita, il residuo della Ser211 è defosforilato da parte della calcineurina e TFEB trasloca nel nucleo, per indurre l'espressione di geni bersaglio (Palmieri M., et al., 2011). Sulla base di questi fatti, è stato studiato se TFEB è coinvolto nell'azione applicata dell'agonista mTOR Torin1 e la trasfezione stabile con il vettore lentivirale pWPXLd-ires-PuroR trasportatore del costrutto GFP-TFEB nelle cellule fibroblastiche immortalizzate da coltura, che esprime la proteina fluorescente verde umana di tipo selvatico (Zhang Z., et al., 2020) in modo costitutivo (Do Minh A., et al., 2021), fusa con TFEB al terminale C. La GFP tag in tale modo diventa costitutivamente espressa nelle cellule. La microscopia confocale ha mostrato, che il TFEB endogeno in condizioni prima dell'attivazione non possa essere rilevato nel citoplasma (Ivankovic D., et al., 2016), anche perché è poco espresso (Klionsky). Per seguire l'effetto della localizzazione di GFP-TFEB è stato testato nel sistema di cellule in coltura trattate con Torin 1, anche TFEB-MYC. TFEB, però, non si eterodimerizza con MYC (Yang M., et al., 2018). I fibroblasti sono stati trattati per 24 ore (per indurre la traslocazione nucleare di TFEB) e visualizzata successivamente la localizzazione subcellulare di TFEB mediante colorazione con immunofluorescenza.

Coerentemente con la perdita di fosforilazione a TFEB Ser-211, il trattamento delle cellule in coltura con Torin1 ha determinato la localizzazione di TFEB nel nucleo, mentre nelle cellule di controllo trattate con DMSO, TFEB-GFP ha mostrato una localizzazione citoplasmatica.

I vettori lentivirali sono molto utili nella terapia delle cellule . La produzione dei vettori lentivirali si fa mediante l'utilizzo delle cellule renali embrionali umane (HEK293) (Manceur AP., et al., 2017). I virus lentivirali hanno alcuni vantaggi rispetto agli altri tipi di virus, utilizzati come vettori (Do Minh A., et al., 2021) tra questi sono l'integrazione genica stabile nel genoma dell'ospite, trasferimento di informazione genetica in cellule in divisione e non in divisione e ampio tropismo tissutale (Manceur AP., et al., 2017).

Oltre a ridurre la fosforilazione di TFEB a livello post-traduzionale, la trasduzione di TFEB esogeno è anche un metodo efficace per migliorare direttamente il contenuto di TFEB nel nucleo (...). Come era previsto la sovraespressione di TFEB nei fibroblasti di topo adulto può migliorare la biogenesi e la funzione lisosomiale attraverso l'attivazione di geni multipli che codificano proteine lisosomiali nel nucleo (...). Studi precedenti hanno riportato che la trasduzione di TFEB esogeno è un metodo efficace per migliorare direttamente il contenuto di TFEB nel nucleo (...). Inoltre, la sovraespressione di TFEB risulta benefica nella riduzione dell'infiammazione e il danno mitocondriale nel tessuto polmonare e nelle cellule dell'epitelio alveolare attraverso la regolazione dell'autofagia mitocondriale nel danno polmonare acuto (Liu W., et al., 2019). Malgrado tutti questi vantaggi nella recensione di (Yang M., et al., 2018) è menzionato il fatto che la sovraespressione di TFEB è significativamente correlata con una prognosi infausta nel carcinoma polmonare non a piccole cellule. La sovraespressione di TFEB in sistemi cellulari e un modello animale

Sono stati esaminati i potenziali effetti dalla sovraespressione di TFEB nel muscolo e si è scoperto che ha portato alla sovraregolazione di numerosissimi geni e aumento della densità , del volume e dell'espressione degli enzimi mitocondriali (Mansueto G., et al., 2016).

La sovraespressione di TFEB in modelli murini delle malattie neurodegenerative come la corea di Huntington, il morbo di Parkinson si è rivelata utile per migliorare la funzione neurologica. In studi sulle cellule il potenziamento della via autofagico-lisosomiale attraverso la sovraespressione di TFEB riduce l'aggregazione delle proteine nei neuroni (Martini-Stoika H., et al., 2016).

Queste osservazioni dimostrano che la sovraespressione di TFEB potrebbe servire come strategia terapeutica per la DE attraverso l'attivazione di ALP.

TFEB è un potente attivatore nella regolazione dell'autofagia e della biogenesi lisosomiale e la sua traslocazione nucleare è strettamente associata alla funzione autofagico-lisosomiale (Settembre C., et al., 2012). Prove emergenti suggeriscono che TFEB può essere un bersaglio farmacologico promettente per alcune malattie umane, compresi i disturbi neurodegenerativi, come AD (malattia ad esordio tardivo) e il PD. L'autofagia è molto importante per i neuroni che non si dividono e in caso di carenze autofagiche in topi si ha un accumulo di aggregati proteici e neurodegenerazione, come è stato riportato da Martini-Stoika H., et al (2016). L'idea di potenziare l'autofagia per contrastare la neurodegenerazione è stata esplorata da molti (Martins WK., et al., 2021) e nella maggior parte dei casi il target molecolare preferito per le strategie terapeutiche proposte è mTOR, in particolare utilizzando specifici inibitori catalitici di mTOR come Torin1 che attiva TFEB innescando la sua traslocazione nucleare, mentre l'inibitore allosterico rapamicina pur avendo la capacità di inibire l'attività di mTOR ha effetti minimi. TFEB è tra i substrati di mTORC1 che sono insensibili alla rapamicina e per questo non significativamente attivato da questo trattamento (Bajaj L., et al., 2019). Nonostante la loro efficacia in alcuni modelli, hanno anche dimostrato di avere una capacità limitata di influenzare le malattie neurodegenerative in alcuni studi clinici. Pertanto, l'inibizione dell'attività mTOR è essenziale per l'aumento della traslocazione nucleare TFEB in quanto si riduce la forma fosforilata di TFEB. Quindi sembra essere un metodo ragionevole per l'attivazione di ALP. Molte linee di evidenza hanno dimostrato che l'attivazione farmacologica con diversi composti o genetica del TFEB rappresenta una strategia terapeutica di successo nei modelli animali di malattie neurodegenerative negli ultimi anni (Cortes CJ., La Spada AR., 2019) e migliorano l'autofagia e l'attività lisosomiale e potrebbero essere utili terapeuticamente per il trattamento delle malattie neurodegenerative, ma potrebbero avere effetti negativi. Si ipotizza che l'attivazione costitutiva delle proteine MiT/TFE guidi la riprogrammazione metabolica nella neoplasia pancreaticca e che la sovraespressione di TFEB/TFE3 sia un segno distintivo di alcuni carcinomi renali [30,101]. Nella recensione di Li M., et al (2021) sono descritte prove che TFEB è coinvolto anche nella regolazione del metabolismo lipidico in molte malattie. Tuttavia, come meccanismo degradativo cellulare essenziale, il livello e la durata dell'attivazione di TFEB devono essere strettamente regolati. Al contrario, l'attivazione inefficiente può non solo essere terapeuticamente inefficace (Liu W., et al., 2019), ma ha anche il potenziale per peggiorare la malattia neurodegenerativa, principalmente aumentando la formazione e la

propagazione degli aggregati. Da notare, il beneficio terapeutico del TFEB è legato alla regolazione dell'autofagia, che conferisce protezione attraverso il mantenimento dell'omeostasi dei mitocondri inducendo la degradazione lisosomiale dei mitocondri danneggiati (Li M., et al., 2021). Pertanto, piccole molecole che possono aumentare l'espressione di TFEB e/o stimolare la sua traslocazione nucleare sono promettenti come terapie modificanti la malattia per bloccare la progressione della neurodegenerazione. Qui, in questa tesi sperimentale è stato dimostrato che l'inibizione di mTORC1 è necessaria per l'attivazione e la traslocazione nucleare di TFEB. È interessante notare che TFEB può anche salvare la disfunzione dei mitocondri promuovendo direttamente la biogenesi mitocondriale (...); pertanto, gli effetti salvatori di TFEB potrebbero non essere interamente attribuiti alla clearance dei mitocondri disfunzionali.

Il meccanismo di regolazione del TFEB è molto complesso e gli agonisti TFEB stanno emergendo dalla ricerca come nuove strategie terapeutiche per la cura di malattie con disfunzione autofagico-lisosomiale. Gli agonisti TFEB dovrebbero attivare l'autofagia e il cambiamento del flusso autofagico. Pertanto, l'attività degli agonisti TFEB può essere determinata.

Il targeting di TFEB utilizzando agenti farmacologici può, quindi, essere molto promettente contro le complicanze infiammatorie cardiache. Curiosamente, il trattamento con DHT ha promosso la localizzazione nucleare di TFEB.

Le linee di cellule di fibroblasti rappresentano un facile modello preclinico ben studiato per i difetti che colpiscono i complessi delle catene respiratorie e sono disponibili nella maggior parte dei casi di pazienti con malattia mitocondriale (...) e includono gran parte dei difetti biochimici. L'utilità dei fibroblasti in coltura riguarda la possibilità di verificare e studiare il meccanismo patogenetico della malattia e, eventualmente, valutare l'efficacia delle singole opzioni terapeutiche. Possono essere ottenute con una biopsia muscolare minimamente invasiva. Le colture di fibroblasti sono altamente proliferative e forniscono una fonte rinnovabile di cellule in vitro. Ciononostante le cellule fibroblastiche non sono considerate ad alta domanda di energia (Hu SY., et al., 2018).

I mitocondri sono organelli ereditati dalla madre e formano una rete completa in molte cellule mantenuta da un intricato equilibrio tra fissione e fusione, biogenesi mitocondriale e mitofagia (Kuhlbrandt W., 2015). Tuttavia, i mitocondri sono facili da danneggiare, portando alla disfunzione mitocondriale e alla distruzione dell'omeostasi cellulare, che è strettamente correlata al verificarsi di una varietà di malattie, come malattie neurodegenerative, malattie cardiovascolari, cancro, malattie metaboliche, infezioni e così via (Doblado L., et al., 2021; Lu Y., et al., 2023). In molte malattie mitocondriali, la disfunzione mitocondriale innesca profonde manifestazioni cliniche, in particolare quelle relative a difetti nella fosforilazione ossidativa. I mitocondri danneggiati sono carenti nella produzione di ATP e altri prodotti biosintetici e rilasciano maggiori livelli di specie reattive dell'ossigeno (Liu W., et al., 2019). Studi precedenti hanno dimostrato che i livelli inferiori di produzione di ATP a causa del difetto di OXPHOS nelle malattie mitocondriali sono insufficienti per il mantenimento della normale

funzione cellulare e potrebbero innescare l'autofagia attraverso l'attivazione dell'AMPK e l'inibizione del mTORC1. I mitocondri stessi sono sensibili al danno ossidante dei ROS alle proteine e al DNA oltre all'attivazione a valle dell'inflammasoma (Lu Y., et al., 2023). Le mutazioni primarie nel DNA mitocondriale (mtDNA) danneggiano la funzione mitocondriale e contribuiscono per l'insorgenza delle malattie mitocondriali. Sotto lo stress dei ROS, della carenza di nutrienti, dell'invecchiamento cellulare e di altri effetti, i mitocondri nelle cellule mostrano danni acuti da depolarizzazione. La depolarizzazione mitocondriale dipendente dai ROS è uno dei principali fattori che attivano l'autofagia mitocondriale (Lu Y., et al., 2023). Si ritiene che la mitofagia è un modo importante per il corpo di eliminare i mitocondri danneggiati o disfunzionali immediatamente e selettivamente, mediante la fissione degli organelli e attraverso la degradazione idrolitica dei lisosomi e anche per mantenere l'equilibrio dell'ambiente, la quantità mitocondriale all'interno delle cellule e la stabilità della rete mitocondriale (...). Tra i molti importanti regolatori della mitofagia identificati finora, PINK1 e Parkin sono i fattori primari per regolare il processo mitofagico.

La mitofagia alterata non favorisce la sopravvivenza cellulare. Il danno mitocondriale causato dalla depolarizzazione mitocondriale e dallo stress ossidativo porta ad un aumento maggiore dei livelli della mitofagia, con conseguente morte cellulare a causa dei lisosomi che inghiottono i mitocondri (...). Mentre una mitofagia debole è causa di una inadeguata clearance di mitocondri disfunzionali e ridotta sopravvivenza delle cellule attraverso il rilascio di molecole che promuovono la morte cellulare e l'accumulo di mutazioni nel mtDNA (Lemasters JJ., 2014). Essendo la mitofagia con un ruolo principale in varie malattie umane, l'attivazione farmacologica con agonisti è diventata un potenziale approccio terapeutico in grado di controllare il processo biologico, come i livelli della mitofagia. Tuttavia, un'attenta modulazione piuttosto che l'attivazione costitutiva sarebbe l'ideale per questo stile di trattamento.

La rapamicina è un inibitore che interferisce con l'inibizione della via di segnalazione mTOR, quindi è un agonista TFEB [94]. La rapamicina è già stata un farmaco approvato chiamato "Sirolimus", che è usato per trattare il cancro [5]. Inoltre, il progestinico R5020, il 3,4-dimetossicalcone, la fisetina e il torino 1 sono ancora in fase di sperimentazione preclinica [82,84,86,87].

La rapamicina è un farmaco, inibitore specifico della via di segnalazione bersaglio della rapamicina (mTOR) nei mammiferi (...) e così attiva l'autofagia, approvato dal FDA per l'uso nell'uomo, che ha dimostrato di prolungare la durata della vita e attenuare la progressione della malattia nel modello del topo knockout Ndufs4 (Ndufs4-/-), un modello murino complesso basato sulla malattia di Leigh (...). Il trattamento con rapamicina ha ripristinato il flusso

autofagico e migliorato la biogenesi dei lisosomi e così facendo entrambi i meccanismi hanno contribuito alla clearance dei mitocondri disfunzionali (...). Il trattamento con everolimus, un analogo della rapamicina, in un bambino con sindrome di Leigh ha portato a un beneficio prolungato, mentre un altro bambino con MELAS non ha risposto ed è morto di malattia progressiva (...). Inoltre, uno studio su cellule ibride che esprimono la mutazione LHON m.11778G>A/MTND4 in stato eteroplasmatico ha dimostrato che la rapamicina promuove la mitofagia, con conseguente riduzione dei livelli di mutazione con parziale ripristino dell'ATP [239]. Uno studio di fase 2a, in aperto, per valutare la sicurezza e l'efficacia di ABI-009 (sirolimus legato all'albumina con nanoparticelle) in pazienti con sindrome di Leigh o Leigh-simile è attivo ma non ancora reclutato (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03747328>). La rapamicina migliora il flusso autofagico dopo trattamento a lungo termine in muscoli di topi knockout muscolo specifici COX15^{mq/mq} rispetto a quelli di topi WT. Riduce anche la quantità dei mitocondri difettivi nei topi non trattati. Anche se la rapamicina sembra di essere utile nei modelli di malattia mitocondriale il suo uso terapeutico è preoccupante, perché principalmente è collegato ad effetti collaterali come l'immunosoppressione e l'intolleranza al glucosio (Civiletto G., et al., 2018). La rapamicina ha salvato la capacità respiratoria dei mitocondri e la loro produzione di ATP in presenza di Mn (Zhang Z., et al., 2020). Garza-Lombo C., et al., (2020) riportano nella loro recensione che l'inibizione di mTOR con la rapamicina può diminuire l'espressione del coattivatore del recettore attivato dal proliferatore perossisomiale (PGC)-1 α , la sua attività trascrizionale è in grado di regolare l'espressione genica dei mitocondri e la loro biogenesi. La rapamicina, inoltre, è stata utilizzata sia in vivo che in vitro per ridurre la patologia del morbo di Parkinson.

Torin1 è un inibitore di mTOR [84]. Quando ci sono abbondanti nutrienti e fattori di crescita, TFEB è principalmente citoplasmatico. Tuttavia, dopo il trattamento con Torin1, TFEB è risultato defosforilato e localizzato principalmente nel nucleo. Quindi, il trattamento con Torin1 può trasformare TFEB in una forma rapidamente migrante di bassa fosforilazione, cambiando la distribuzione di TFEB dall'intera modalità di diffusione cellulare a quasi tutte le cellule nucleari. Questo fenomeno è stato osservato in molti tipi di cellule [92]. La regolazione TFEB tramite Torin1 è stata attribuita al cambiamento della fosforilazione di S211. La mutazione da S211 ad A aumenta la traslocazione nucleare TFEB [93]. L'iniezione intra-articolare di Torin 1 può ridurre la degenerazione della cartilagine articolare nell'osteoartrite indotta da collagenasi (OA), almeno parzialmente mediante attivazione dell'autofagia, e attiva TFEB inibendo mTOR [85].

Attualmente sono stati sviluppati farmaci correlati a TFEB. Un composto sintetico analogo della curcumina chiamato C1 è stato dimostrato come un nuovo agonista diretto del TFEB che migliora la sua traslocazione nucleare. C1 si lega specificamente attraverso il legame al N-terminale di TFEB (...) e non influenza il suo stato di fosforilazione. È interessante notare che TFEB promuove la fosforilazione di RPS6KB1 e mTOR, che conferma che C1 attiva TFEB senza inibire l'attività di mTOR. Allo stesso tempo, si è scoperto che C1 non ha quasi alcun effetto sull'attività delle chinasi correlate a mTOR, che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'autofagia. È stato dimostrato che TFEB è particolarmente richiesto quando C1

promuove l'autofagia attraverso gli esperimenti in cui i geni chiave dell'autofagia Atg5 (correlati all'autofagia 5), Becn1 (beclina 1) e TFEB nelle cellule N2a sono stati abbattuti. C1 è di stabilità strutturale e buona permeabilità della barriera emato-encefalica, quindi è un potenziale farmaco per le malattie neurodegenerative (...). L'analogo della curcumina C1 funziona sui topi transgenici umani omozigoti P301S tau e sui topi omozigoti 3xTg, ed è ancora negli studi preclinici [81]. ed è stato dimostrato che migliora la proteina precursore dell'amiloide-beta e la patologia tau nei modelli di malattia di Alzheimer (Song et al., 2020). Lu Y., et al (2023) hanno descritto che la curcumina possa promuovere la mitofagia Parkin-dipendente attraverso la via del segnale AMPK-TFEB.

Sono state trattate e analizzate linee cellulari di fibroblasti primari immortalizzate WT e sane di controllo, coltivate in mezzo di glucosio standard con il 3-fluorometossi carbonil cianuro fenilidrazone (FCCP) per promuovere la depolarizzazione mitocondriale e così anche la frammentazione mitocondriale (Belousov DM., et al., 2021). FCCP è un disaccoppiatore, protonoforo non specifico, con proprietà acide deboli e lipofilo (Belousov DM., et al., 2021) spesso utilizzato nella biologia cellulare come sonda chimica per stimolare la mitofagia, inducendo la massima capacità di respirazione e come conseguenza la frammentazione della rete mitocondriale, perché causa una veloce e grave perdita del potenziale della membrana mitocondriale (Ashrafi G., et Schwarz TL., 2013; Killackey SA., et al., 2020) e interrompe i movimenti dei mitocondri nelle cellule 3T3 e i neuriti di polo (Demine S., et al., 2019). *Il disaccoppiamento della respirazione causa un profondo deficit bioenergetico, diminuendo il contenuto di sintesi di ATP che crea uno stato metabolico che assomiglia molto alla privazione dei nutrienti e quindi stimolante l'autofagia* (Lemasters JJ., 2014). Poiché FCCP provoca perdite di protoni non solo dallo spazio intermembrana al citoplasma, ma anche dai lisosomi, tutti questi eventi provocano l'acidificazione citoplasmatica. Si ritiene che l'acidificazione citoplasmatica potrebbe essere il principale fattore che porta all'induzione della mitofagia (Lemasters JJ., 2014; Killackey SA., et al., 2020). Inoltre, FCCP non è specifico per i mitocondri, è con uso limitato a causa della sua capacità di accumularsi anche in altre strutture di membrana, interrompendo il metabolismo della cellula (Demine S., et al., 2019; Belousov DM., et al., 2021). Anche in basse dosi FCCP è citotossico (Lu Y., et al., 2023).

Un altro metodo, comunemente usato con il quale è stata indotta la mitofagia, è l'impiego dell'oligomicina A, inibitore dell'ATP sintasi (Belousov DM., et al., 2021). L'oligomicina è prodotta da batteri del genere *Streptomyces* (...) e indicata come antibiotico macrolide che inibisce il canale protonico dell'ATP-sintasi (Killackey SA., et al., 2020). Il suo impiego come induttore della mitofagia è meno tossico a livello cellulare e più adatto per provocare una mitofagia spontanea (Lu Y., et al., 2023). L'inibizione dell'ATP sintasi non provoca perdita del potenziale della membrana mitocondriale (Mansueto G., et al., 2016).

E' stata valutata l'efficacia di alcuni agenti farmacologici comuni che sono stati utilizzati come induttori della mitofagia nei modelli di fibroblasti wild type ottenuti da topi adulti- Torin1, Rapamicina e il derivato sintetico della curcumina C1.

Per poter valutare la mitofagia nelle linee cellulari di fibroblasti è stata utilizzata la microscopia a fluorescenza per cellule fisse. Questo è uno strumento utile che permette di visualizzare e quantificare la colocalizzazione dei mitocondri con autofagosomi e i lisosomi per un gran numero di cellule. Ogni cellula contiene da 100 a 1000 mitocondri e pertanto è stata necessaria una rigorosa quantificazione delle cellule analizzate. La fluorescenza totale dei campioni delle cellule è stata analizzata attraverso l'asse Z, poiché la risposta alla mitofagia non è uguale in tutte le cellule (Hamacher-Brady A., et Brady RB., 2016). Gli obiettivi di risoluzione per l'imaging sono stati di 45X. Nei campioni fissi il gradiente di pH attraverso le membrane lisosomiali è perso e si deve considerare la proteolisi all'interno dei lisosomi oltre alla denaturazione acida irreversibile. L'uso delle cellule fisse permette un'osservazione più lunga per le analisi statistiche della auto/mitofagia. Uno dei sistemi reporter di mitofagia meglio caratterizzati e adoperato in questa tesi è il mito-QC, una fusione tag di due proteine fluorescenti mCherry-GFP (...) in tandem fuso alla sequenza di targeting mitocondriale della proteina localizzata nella membrana mitocondriale esterna FIS1 (McWilliams TG., et al., 2016). Mito-QC è di per sé una sonda fluorescente mitocondriale sensibile al pH. In condizioni non perturbate, il mito-QC mostra fluorescenza rossa (mCherry) e verde (GFP), che è donatore. I mitocondri normali sono visualizzati in generale in fluorescenza gialla a causa del segnale combinato tra GFP e mCherry (Ma X., et Ding WX., 2020). La fluorescenza delle due proteine in fusione è invece diversa nell'ambiente lisosomiale. La GFP è sensibile, perché ha una fluorescenza acida labile, il suo segnale si spegne nel lisosoma con ambiente acido, quando avviene la fusione con l'autofagosoma. Mentre mCherry è stabile all'ambiente acido

lisosomiale e rappresenta il grado di flusso mitofagico⁴ e questo fatto permette il monitoraggio e la quantificazione dei puncta-rossi in ogni cellula della mitofagia indotta in vitro. Pertanto, il reporter mito-QC può essere utilizzato per campioni fissi. Durante la mitofagia, i mitocondri sequestrati all'interno degli autofagosomi si acidificano e si fondono con i compartimenti lisosomiali acidi (Lemasters JJ., 2014) e mostrano solo fluorescenza rossa (mitolisosomi, etichettati soltanto con mCherry). Tuttavia, va notato che il mito-QC è collegato al lato citoplasmatico della membrana mitocondriale esterna e che la maggior parte delle proteine della membrana mitocondriale esterna, inclusa la fusione GFP-mCherry-FIS1 sono vulnerabili alla degradazione dal sistema proteasoma ubiquitina durante la mitofagia e le proteine della membrana mitocondriale interna sono più specifiche per la mitofagia.

L'induzione della mitofagia aumenta la localizzazione nucleare di TFEB, che aumenta ulteriormente l'espressione di proteine lisosomiali (Doblado L., et al., 2021) senza il coinvolgimento di mTORC1 (Nezich C., et al., 2015). Inoltre la traslocazione del TFEB nel nucleo aumenta la sua stessa espressione. L'attivazione chimica di TFEB promuove l'induzione della mitofagia il reclutamento di autofagosomi ai mitocondri in condizioni fisiologiche e recluta PINK1 e Parkin mitocondriale⁵ per potenziare la mitofagia sotto stress mitocondriale acuto nelle cellule di coltura (Ivankovic D., et al., 2016; Tan S., et al., 2019). Sono coinvolte anche le proteine autofagiche p62 (SQSTM1), ATG9A e ATG5, canoniche dell'autofagia (Cortes J C., et al., 2019; Zhou X., et al., 2019; Liu W., et al., 2019; Ivankovic D., et al., 2016; Nezich C., et al., 2015; Medina DL., et al., 2015; Settembre C., et al., 2012; Zhu l., et al., 2020; Zhang Z., et al., 2020). In questo modo, TFEB facilita la clearance mitocondriale. Ciò significa che la mitofagia è regolata da TFEB (Settembre C., et al., 2012). Dopo l'induzione della mitofagia mediante un trattamento di 10 ore con antimicina A (inibitore del complesso III) o con il disaccoppiatore valinomicina, le cellule HeLa che esprimono parkina mostrano una maggiore localizzazione nucleare del fattore di trascrizione TFEB (Nezich CL., et al., 2015). Inoltre, sembra che la regolazione di TFEB sotto stress mitocondriale acuto possa essere indipendente dalla calcineurina. Complessivamente, nei studi finora pubblicati è dimostrato che sia in vivo che in vitro il malfunzionamento acuto dei mitocondri provoca l'entrata di TFEB nel nucleo e la biogenesi lisosomiale. In uno studio di Fernandez-Mosquera L., et al., 2017 si

⁴Il flusso mitofagico è una misura della degradazione dell'autofagia che richiede la fusione autofagosoma-lisosoma e di conseguenza la degradazione dei mitocondri.

⁵Tan S., et al., 2019 ha riferito che l'estratto di melograno potenzia la mitofagia per eliminare l'accumulo di mitocondri disfunzionali e specie reattive dell'ossigeno in modo TFEB-dipendente.

è utilizzato l'inibitore del complesso I rotenone o il disaccoppiatore CCCP per testare come la durata della compromissione mitocondriale influenzi la biogenesi lisosomiale. In accordo con studi precedenti (Ivankovic D., et al., 2016), gli autori hanno riferito che i trattamenti acuti con rotenone o CCCP hanno innescato la biogenesi lisosomiale. Nelle cellule proliferanti sia in vivo, sia in coltura, il malfunzionamento mitocondriale acuto innesca la segnalazione TFEB e promuove la biogenesi lisosomiale. Tuttavia, la disfunzione mitocondriale cronica porta a una repressione dell'attività di TFEB e della biogenesi lisosomiale (Fernandez-Mosquera I., et al., 2019; Diogo C., et al., 2021). Questo effetto bifasico è in parte spiegato dall'attivazione di AMPK una proteina chinasi eterotrimerica che blocca rapidamente l'attività su mTORC1 (Paquette, M., et al, 2021; Collodet, C., et al., 2019; El-Houjeiri, L., et al., 2019;), in caso di malfunzionamento mitocondriale acuto, che è necessario per l'attivazione della biogenesi lisosomiale TFEB- o MITF-dipendente. Sotto stress cronico, AMPK non è più attivo e quindi TFEB/MITF mancano del loro stimolo di attivazione. Questo meccanismo può essere collegato all'azione di TFEB sull'induzione dei geni dell'autofagia. L'AMPK è considerato il sensore dello stato energetico cellulare ed è regolato da diversi stimoli, quali oscillazioni dei livelli di calcio intracellulare, alterazioni delle specie reattive all'ossigeno e variazioni del rapporto AMP/ATP. AMPK è pertanto un sensore dello stato nutrizionale della cellula. In caso di mancanza di nutrienti, AMPK è attivato e fosforila mTORC1, inattivandolo e inducendo la biogenesi lisosomiale e l'autofagia, al fine di liberare substrati energetici da proteine, lipidi e zuccheri complessi. L'attivazione farmacologica di AMPK promuove la traslocazione di TFEB, senza influenzare lo stato di fosforilazione di mTOR. Il bersaglio di rapamicina nei mammiferi (mTORC1) e la chinasi AMP-dipendente (AMPK) sono i principali fattori regolatori che modulano la mitofagia a livello post-traduzionale (Belousov DM., et al., 2021). Inoltre, la disponibilità di aminoacidi e la carica energetica cellulare regolano la formazione dell'autofagosoma attraverso la protein chinasi A e l'asse di segnalazione AMPK-mTORC1-ULK1/267. I meccanismi alla base della compromissione della funzione lisosomiale durante il deficit mitocondriale cronico rimangono sconosciuti. Un possibile collegamento è che potrebbe essere dovuto al fatto che la biogenesi lisosomiale è necessaria per la degradazione dei mitocondri difettivi attraverso la mitofagia, ma nel lungo termine questo comporta un

⁶Menzionato nella recensione di Bajaj L., et al., 2019, Lysosome biogenesis in health and disease. ULK1 è il fattore di inizio dell'autofagia e quando è fosforilato da mTORC1 è inibita l'autofagia.

⁷Civiletto G., et al., 2018, Rapamycin rescues mitochondrial myopathy via coordinated activation of autophagy and lysosomal biogenesis, mTORC blocca l'autofagia, quando fosforila ULK1, che è una chinasi che conduce la formazione di autofagosomi

esaurimento della capacità degradativa da parte dei lisosomi. Un'altra possibilità è che le specie reattive dell'ossigeno rilasciate dai mitocondri inibiscano le proteine chiave del lisosoma. In particolare, i meccanismi che portano all'attivazione di TFEB da parte della mitofagia implicano un effetto specifico del malfunzionamento mitocondriale sulla biogenesi lisosomiale. La rimozione tempestiva ed efficiente dei mitocondri danneggiati mediante mitofagia è fondamentale per il controllo di qualità mitocondriale e il mantenimento delle normali funzioni cellulari sotto stress patologico come l'esposizione a manganese, in uno studio recente (Zhang Z., et al., 2020) nel quale si sono utilizzati astrociti primari di topo come sistema modello, è stato scoperto che il manganese sopprime l'attività dei TFEB, che a sua volta inibiva il flusso autofagico. Gli effetti del manganese sull'autofagia sono stati ulteriormente convalidati negli astrociti striatali di un modello murino subacuto esposto a manganese. Il ripristino dell'autofagia mediante sovraespressione di TFEB o l'utilizzo di rapamicina ha parzialmente migliorato i deficit respiratori mitocondriali indotti dal manganese, l'esaurimento di ATP e l'eccessiva produzione di ROS mitocondriali. Questi risultati hanno stabilito una relazione causale tra autofagia compromessa e disfunzione mitocondriale nella citotossicità indotta dal manganese e hanno identificato TFEB come potenziale bersaglio terapeutico. Si è anche evidenziato che nelle cellule esposte al manganese si è inibita la localizzazione nucleare del TFEB e l'attività trascrizionale. Sembra invece che gli effetti di salvataggio del TFEB non possono essere interamente attribuiti al riciclaggio dei mitocondri disfunzionali. In un altro studio (Mansueto G., et al., 2017) è stato dimostrato che l'esercizio fisico promuove la traslocazione nucleare del TFEB nei nuclei dei miociti, che regola l'omeostasi del glucosio e controlla il metabolismo del glucosio e del glicogeno e può anche conservare la funzione dei mitocondri favorendo, la biogenesi mitocondriale. Simile evento è stato osservato anche in un terzo studio (Ivankovic D., et al., 2016) dove TFEB è stato mostrato per modulare PGC-1 α , il principale regolatore della biogenesi mitocondriale e aumentare il contenuto mitocondriale delle cellule. TFEB è un bersaglio trascrizionale di PGC-1 α e la sovraespressione di PGC-1 α aumenta l'espressione di TFEB (Bajaj L., et al., 2019). Si ritiene che, l'attivazione dei TFEB a seguito dell'induzione della mitofagia può svolgere un ruolo nella biogenesi dei mitocondri e dei lisosomi. La sovrapposizione di vie a monte può stimolare sia i membri del MiT che il PGC-1 α . Ad esempio, i due sensori metabolici AMPK e Sirtuin-1 (SIRT1) sono stati entrambi implicati nella regolazione di PGC-1 α e TFEB. Esperimenti in vitro e in vivo che coinvolgono la sovraespressione di TFEB in varie linee cellulari e tessuti hanno dimostrato che TFEB può legarsi al promotore PPARGC1A e attivare direttamente la sua trascrizione (Settembre C., et al., 2013; Mansueto G., et al., 2017). Il knock-out di PGC-1 α può diminuire l'espressione di

TFEB nel muscolo scheletrico (Mansueto G., et al., 2017; Erlich AT., et al., 2018). Insieme questi dati suggeriscono un meccanismo coordinato di biogenesi lisosomiale e mitocondriale. Diventa quindi ovvio un ruolo fondamentale del TFEB nel controllo della qualità mitocondriale e l'inibizione mTOR con l'induzione di Rapamicina o TFEB ha ripristinato la segnalazione di PGC-1 α -TFEB e ha annullato il controllo della qualità mitocondriale alterato e le caratteristiche neurodegenerative (Siddiqui A., et al., 2015). Inoltre, è stato confermato in un numero crescente di studi precedenti che la sovraespressione di TFEB porta a una maggiore degradazione dei mitocondri danneggiati (Wang S., et al., 2020).

TFEB è uno strumento molecolare per adattare le cellule allo stress, tra cui la fame e l'esaurimento energetico (...).

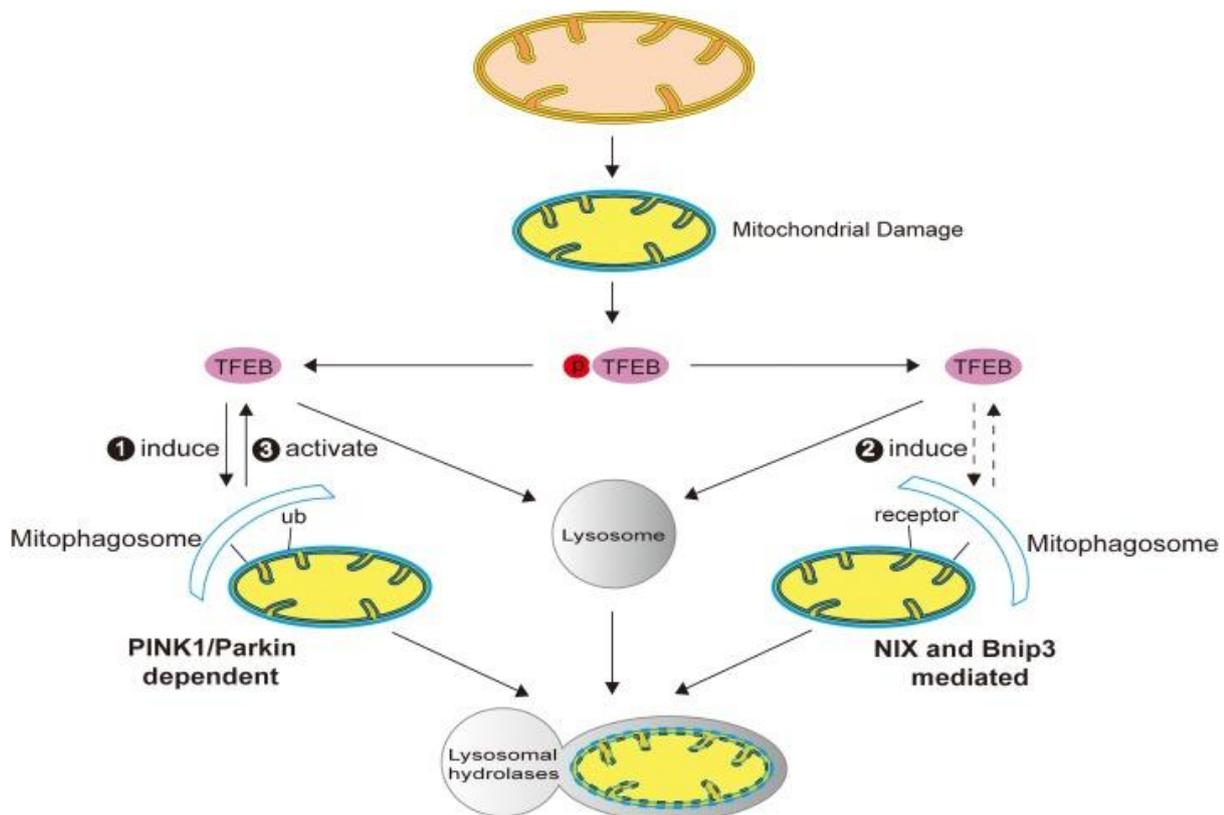


Figura 9: Figura

Il sequestro e la degradazione dei mitocondri richiede una maggiore attività autofagica. La capacità di autofagia è sotto il controllo del fattore di trascrizione EB (TFEB) che promuove l'espressione di geni autofagosomali e lisosomiali. mTOR inibisce TFEB fosforilandolo.

1,3. TFEB contribuisce alla mitofagia mediata da parkin e quindi la capacità autofagica è legata all'efficienza mitofagica.

2. L'aumento della segnalazione TFEB migliora la mitofagia indotta da BNIP3. BNIP3 e NIX inducono la mitofagia in risposta alle condizioni ipossiche e direttamente promuovono la depolarizzazione della membrana mitocondriale e la fusione con le membrane cellulari. Entrambe le proteine sono omologhe e di transmembrana. Attraverso il loro legame N-terminale con la proteina Rheb si ha una ridotta attivazione di mTOR e quindi una maggiore autofagia e attività di TFEB. Inoltre, in condizioni ipossiche i mitocondri non sono in grado di completare OXPHOS.

vi è un interesse emergente nella regolazione farmacologica della mitofagia per il trattamento di patologie correlate ai mitocondri. Tuttavia, ad oggi, sono stati riportati solo pochi studi sull'uomo sui modulatori della mitofagia. La stragrande maggioranza dei dati disponibili proviene da studi preclinici. Composti naturali, come estratti di melograno e *Ginkgo biloba*, o modulatori di composti chimici della mitofagia sono stati testati principalmente in vitro [412,413,414]. Con i continui investimenti, vengono scoperti sempre più farmaci (tabella (Tabella 2).2). Tuttavia, la ricerca sui modulatori della mitofagia è ancora preliminare a causa del breve tempo di ricerca complessivo e la maggior parte dei dati proviene da studi preclinici. Prima che questi modulatori entrino in studi clinici o vengano studiati nuovi potenti modulatori efficaci, devono essere considerate le seguenti due condizioni.

In primo luogo, per essere mirati terapeutamente, questi modulatori devono colpire specificamente i mitocondri per regolare la mitofagia. Tuttavia, i modulatori scoperti finora hanno una specificità limitata per la mitofagia a causa della loro bassa specificità farmacologica per i bersagli mitofagici. È un approccio logico per trovare modulatori che regolano indirettamente la mitofagia. Tuttavia, potrebbe non essere adatto per uso terapeutico a causa degli effetti off-target altamente potenti.

Negli studi di biologia cellulare, questi ionofori protonici (H) debolmente acidi, noti anche come protonofori, sono frequentemente utilizzati come induttori della mitofagia. I protonofori tipici sono principalmente Carbonyl Cyanide M-Chloro Phenyl Hydrazone (CCCP), Carbonyl Cyanide-P-(Trifluoromethoxy) Phenyl Hydrazone (FCCP) e 2,4-Dinitrophenol (DNP), ecc. Sono stati spesso impiegati come sonde chimiche per stimolare la mitofagia e studiare potenziali meccanismi di mitofagia. In particolare, tali protonofori inducono la mitofagia attraverso lo stesso meccanismo: la dissipazione mediata da protoni di MMP (Figura(Figura 6D).6D). Sebbene i protonofori siano ampiamente utilizzati, hanno ancora una serie di limitazioni nell'indurre la mitofagia. Ad esempio, 1) la specificità è bassa e agiscono sull'intera popolazione mitocondriale piuttosto che su un sottogruppo specifico. Inoltre, non solo hanno attività sulle membrane mitocondriali, ma anche su altre membrane plasmatiche, causando effetti fuori bersaglio. 2) Sono altamente tossici e possono persino portare alla completa scomparsa dei mitocondri nel corpo dopo un trattamento a lungo termine. Vale a dire, hanno una grande citotossicità. In particolare, anche quando la dose di FCCP è troppo bassa per causare la dissipazione di MMP, è già citotossica^{168,169}. 3) Questo metodo innaturale, che non è conforme al processo fisiologico, è dannoso per i mitocondri in larga misura e porterà al fallimento mitocondriale

Quando si inizia a discutere quali composti sarebbero adatti per il trattamento basato sulla mitofagia, è ovvio che composti come il cianuro di carbonile 3-clorofenilidrazone sono tossici e non saranno utilizzabili a causa dei loro diffusi effetti fuori bersaglio ([Ashrafi et al., 2014](#)).

È accettato che i prodotti di due geni che sono mutati nel parkinsonismo autosomico recessivo, PINK1 e Parkin, normalmente funzionano insieme per indurre la mitofagia. Inoltre, un certo numero di geni che modificano PINK1 e/o la mitofagia mediata dal Parkin sono stati identificati mediante RNAi genome-wide ([Hasson et al., 2013](#),[Ivatt et al., 2014](#)) e CRISPR ([Potting et al., 2018](#),[Hoshino et al., 2019](#)) schermi.

Si ritiene che la mitofagia compromessa contribuisca a varie malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson, il morbo di Alzheimer e la malattia di Huntington.^{4–7} Inoltre, prove crescenti supportano un ruolo protettivo della mitofagia contro il danno epatico indotto da

sovradosaggio di paracetamolo, consumo di alcol e infezione virale rimuovendo i mitocondri danneggiati.[8–10](#)

Numerosi studi hanno fatto uso dei vantaggi di TFEB nell'aumentare la clearance cellulare in un certo numero di modelli cellulari e murini di disturbi umani associati all'accumulo di sostanze chimiche non degradate a causa del suo coinvolgimento cruciale nell'ALB.[4,8,24–29](#) Disturbi da accumulo lisosomiale (LSD), malattie metaboliche,[30](#) Malignità³¹ e le malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson sono alcuni esempi di malattie umane causate dalla disregolazione dell'attività di TFEB.

Conclusioni

Una rete mitocondriale sana è essenziale per l'omeostasi cellulare. Ciò richiede in condizioni normali il coordinamento della sintesi di nuovi mitocondri (biogenesi mitocondriale), insieme alla degradazione degli organelli disfunzionali attraverso il processo dell'autofagia mitocondriale specifica (mitofagia). I mitocondri svolgono una varietà di funzioni nella cellula, inclusa la ben nota produzione di energia attraverso la fosforilazione ossidativa. Per questo motivo, la disfunzione mitocondriale è il fondamento per numerose malattie genetiche con ampio spettro. I disturbi mitocondriali dimostrano grande complessità e presentazioni cliniche variabili. Nonostante l'eterogeneità delle malattie e dei difetti genetici, il tipo finale di stress cellulare è simile. Nella maggior parte dei casi c'è un difetto bioenergetico o una maggiore produzione di ROS. Mentre la funzione mitocondriale è stata a lungo considerata fondamentale per la salute della cellula, il complesso argomento delle origini mitocondriali della malattia sta solo iniziando ad essere esplorato poiché la fisiopatologia delle malattie mitocondriali è ancora poco conosciuta. Tutto ciò ha un enorme potenziale per scoprire nuove strategie terapeutiche per molte malattie potenzialmente letali e aumentare la qualità complessiva della vita. Sono stati proposti diversi approcci per il trattamento dei disturbi mitocondriali, tuttavia le loro applicazioni nella clinica sono ancora in ritardo rispetto ai progressi nella diagnosi di questi disturbi e sono rappresentati da sfide enormi e peculiari allo sviluppo di terapie efficaci. Le sfide dipendono:

- 1) dalla natura ubiquitaria dei mitocondri, le conseguenti manifestazioni eterogenee associate al coinvolgimento multisistemico in vari disturbi mitocondriali. Spesso sono colpiti diversi organi;
- 2) dalla presenza di eterogeneità quale causa della doppia origine genetica delle proteine mitocondriali in parte dovuta all'elevato numero di geni associati, ciascuno coinvolto in malattie specifiche, in parte alla variabilità intrinseca della genetica mitocondriale, in cui la stessa mutazione nel mtDNA può portare a fenotipi diversi, anche all'interno della stessa famiglia e dalla comprensione clinica della progressione della malattia;
- 3) dalla complessità della genetica molecolare, per i meccanismi genetici molecolari con il doppio controllo del genoma e per lo screening genetico, come anche di identificare il difetto genetico. Pertanto il processo diagnostico delle malattie mitocondriali è solitamente complicato e molto lungo ed oltre tutto limitato a metà dei casi sospesi, sebbene vi sia un chiaro sospetto di un difetto mitocondriale, il difetto finale dietro la correlazione tra il genotipo-fenotipo rimane non compreso. Correggere il difetto in tutti loro è ancora impegnativo e può implicare diversi approcci complementari e mancano ancora terapie efficaci;
- 4) di istopatologia, per le caratteristiche neuropatologiche nella malattia mitocondriale. Il cervello è spesso colpito da disturbi mitocondriali, che è protetto dalla barriera ematoencefalica, che impedisce alla maggior parte dei farmaci di raggiungere questo organo;
- 5) di biologia per comprendere meglio le basi molecolari e cellulari delle malattie mitocondriali e identificare possibili bersagli per nuovi trattamenti;
- 6) dalla fisiologia mitocondriale.

Possono quindi tutti quanti determinare i meccanismi e il trattamento per migliorare in definitiva la vita dei pazienti con malattia mitocondriale. I recenti sforzi in questo campo per fornire un approccio più mirato sono promettenti. Gli studi clinici, istopatologici e screening molecolari genetici e virtuali farmacologici di piccole molecole che utilizzano linee cellulari di pazienti o geneticamente modificate hanno identificato nuovi bersagli. Inoltre, possono contribuire per lo sviluppo di sistemi modello di malattie determinare i meccanismi e il trattamento con lo scopo di migliorare la vita degli affetti da malattia mitocondriale. Attualmente, solo un farmaco, l'idebenone, ha fornito prove scientifiche sufficienti per l'approvazione della FDA/Agenzia europea per i medicinali (EMA) per la malattia

mitocondriale e questo uso è solo per la perdita visiva acuta in LHON. Il futuro per la medicina mitocondriale sembra dinamico, in generale. Una cura definitiva per le malattie mitocondriali non è ancora disponibile da oltre 30 anni, ma i significativi progressi raggiunti da un decennio offrono la reale speranza che alcune delle strategie terapeutiche proposte saranno disponibili con un effetto positivo sulla malattia. Ad oggi le strategie di trattamento sono prevalentemente basate sui sintomi, concentrandosi principalmente su strategie riparative o preventive durante episodi di scompenso metabolico acuto dovuti a fattori di stress fisiologici. Questi includono la terapia genica e l'editing del genoma, le opzioni riproduttive, nonché il riutilizzo di farmaci e la scoperta di nuove molecole mirate ai meccanismi patogenetici chiave.

Il razionale dell'utilizzo dei fibroblasti come modello di malattia è che queste cellule possono essere isolate ed espanse facilmente e con poco sforzo economico, il che consente di analizzare grandi coorti di soggetti. Tuttavia, questo modello presenta alcune limitazioni. Infatti, i disturbi mitocondriali influenzano tessuti ad alta domanda di energia, ma i risultati sono basati sui fibroblasti primari isolati in vitro non possono essere applicati per tali tessuti o per pazienti, perché i difetti osservati in questo studio sono limitati nel contesto molecolare che non ha influenza per l'esito clinico. I fibroblasti primari non sono considerati di avere un'elevata domanda di energia. Comunque, l'utilizzo di fibroblasti primari come modello è utile per la ricerca di base, per studi clinici e per la terapia personalizzata. I fibroblasti in coltura dipendono dalla glicolisi per la produzione di energia piuttosto che da OXPHOS e pertanto sono mantenuti in mezzi ricchi di glucosio integrati con uridina (Saada A., 2014).

In questa tesi è stato dimostrato che l'inibizione della chinasi mTORC1 promuove la traslocazione nucleare di TFEB ed è quindi necessaria per la sua attivazione. Quindi TFEB possa essere modulato dalla fosforilazione e l'inibizione della chinasi è con potenziale farmacologico. Sulla base dei studi condotti in vitro, si è chiarito che l'aumento della traslocazione nucleare di TFEB, sia attraverso l'inibizione di mTOR a livello post-traduzionale o la sovraespressione di TFEB a livello trascrizionale, è benefico per il trattamento dei fibroblasti in coltura, grazie alla sua capacità di migliorare la clearance mirata all'ALP. Questo fatto è molto interessante per la terapia delle malattie neurodegenerative. Malgrado, l'attivazione di questo fattore di trascrizione sembra benefica nei disturbi neurologici e lisosomiali, tuttavia può conferire un vantaggio adattativo alle cellule tumorali. Inoltre, la chinasi mTOR è coinvolta nella regolazione della crescita cellulare e nel metabolismo, gli effetti collaterali dei farmaci inibitori dell'mTOR attuali sono imprevedibili. Dunque, c'è il limite del loro uso per lungo termine. La scoperta di farmaci nuovi o sostanze chimiche mirate ad aumentare la traslocazione nucleare di TFEB, ma indipendenti da mTOR potrebbero avere potenziali effetti terapeutici sulla mitofagia, che devono ancora essere studiati in futuro. L'attivazione di questo fattore di trascrizione sembra benefica in molti disturbi neurologici e lisosomiali, ma può conferire un vantaggio adattativo alle cellule tumorali.

E' stato dimostrato che il reporter mito-QC è uno strumento accurato per analizzare la mitofagia in vitro nelle linee cellule fibroblastiche primarie fissate. Questa tesi dimostra che il reporter mito-QC è uno strumento molto robusto per analizzare la mitofagia nelle cellule fibroblastiche primarie in vitro.

La disfunzione mitocondriale è implicata in quasi tutte le malattie e recenti scoperte suggeriscono percorsi verso la manipolazione terapeutica della mitofagia. La rilevanza centrale della mitofagia in tutte le malattie legate al controllo metabolico è ormai ben consolidata. Poiché la mitofagia è un meccanismo omeostatico critico coinvolto nella rimozione dei mitocondri danneggiati e disfunzionali generati a seguito di lesioni cellulari o processi associati alla malattia, previene il malfunzionamento mitocondriale e i successivi eventi molecolari, come lo stress ossidativo, che portano allo sviluppo della malattia. È stato scoperto che la regolazione della mitofagia con i modulatori può diventare una nuova direzione per il trattamento di alcune malattie. In particolare attivatori o induttori, possono avere un grande potenziale terapeutico nelle malattie. Di conseguenza, è necessario continuare a ricercare come le malattie sono influenzate dalla mitofagia. La mitofagia regola la bioenergetica cellulare e la segnalazione redox durante la differenziazione e l'invecchiamento. A tal fine, la continua delucidazione dei meccanismi alla base della regolazione della mitofagia positiva e negativa, nonché dei ruoli della mitofagia durante condizioni normali e stressate sarà determinante nello sviluppo di strategie di trattamento. Negli stati malati, la mitofagia può talvolta compensare parzialmente altri deficit alleviandoli, ma quando l'attività mitocondriale è compromessa, la mitofagia può effettivamente svolgere un ruolo dannoso. Ciò è particolarmente evidenziato nelle malattie in cui la normale attività mitofagica è compromessa da eventi genetici o regolatori. Questi risultati hanno potenziato la ricerca farmacologica nel campo, dal momento che ci sono diversi bersagli potenzialmente farmacologici lungo il percorso della mitofagia. Pertanto, la mitofagia imperfetta può portare alla sindrome metabolica e alla patogenesi di molte malattie umane.

Sebbene, la comprensione del percorso mitofagico sia avanzata in modo significativo, è chiaramente debole nel tradurre la ricerca meccanicistica in farmaci terapeuticamente efficaci.

Allo stato attuale mancano studi clinici sulla modulazione diretta della mitofagia e la maggior parte degli induttori della mitofagia negli studi clinici mostra effetti pleiotropici con meccanismi non identificati e l'efficacia clinica non completamente definita. Al giorno d'oggi, il metodo tradizionale per innescare la mitofagia in vitro è quello di indurre il collasso di MMP e la stabilità di PINK1 con metodi chimici. Fino ad ora, la stragrande maggioranza degli induttori della mitofagia sono stati essenzialmente tossine mitocondriali o disaccoppiatori mitocondriali, che hanno numerose limitazioni, come bassa specificità, alta tossicità e danno respiratorio.

Capire come indirizzare specificamente i mitocondri per regolare la mitofagia e come rilevare specificamente il flusso mitofagico può portare a scoperte per l'applicazione della terapia mirata all'agente che induce la mitofagia negli studi clinici. Un apprendimento approfondito e un migliore utilizzo della moderna tecnologia di rilevamento saranno utili per la ricerca futura e la verifica di vari regolatori della mitofagia.

Il classico modo comune per innescare la mitofagia in vitro è indurre la depolarizzazione del potenziale della membrana mitocondriale da parte dei reagenti chimici. La maggior parte degli induttori della mitofagia sono ancora oggi disaccoppiatori mitocondriali o tossine mitocondriali, che hanno molte limitazioni. Il punto più importante è che l'efficacia clinica dei modulatori della mitofagia non è stata completamente stabilita. Con lo sviluppo di nuove tecnologie e intelligenza artificiale, la scoperta di nuovi regolatori della mitofagia può essere basata sulla scoperta di prodotti naturali, sulla progettazione razionale di farmaci di specifiche proteine bersaglio e sullo screening fenotipico. Sebbene ci siano ancora molte domande senza risposta sulla mitofagia, si ritiene che il targeting della mitofagia è un trattamento promettente per malattie per le quali attualmente non esiste una terapia utile.

Negli ultimi anni, sono stati fatti notevoli progressi nella comprensione di quali condizioni specifiche e come la mitofagia viene attivata su base cellulare. L'importanza della mitofagia in una varietà di malattie è stata ben documentata. Tuttavia, la mitofagia è molto più complessa e varia a seconda dello stato metabolico, delle condizioni di stress e dello stadio di sviluppo dei tessuti. La mitofagia mediata da percorsi multipli mostra parallelismo, alternative e ridondanza funzionale. Le domande sull'interazione tra i diversi percorsi della mitofagia, le regole di regolazione spazio-temporale dei diversi recettori mitofagici in diverse condizioni fisiologiche e patologiche e il ruolo delle componenti della mitofagia in vivo esistono ancora e devono essere risolte. Un approccio da considerare è quello di studiare organismi distinti privi di recettori mitofagici singoli o multipli, stimolarli con condizioni diverse e incrociarli con modelli di malattie genetiche per scoprire quali percorsi specifici fanno in condizioni fisiologiche o patologiche. Inoltre, con il recente sviluppo di modelli in vivo con varie sonde reporter fluorescenti, è diventato possibile ricercare la mitofagia nei tessuti viventi. L'utilizzo di modelli distinti per studiare l'autofagia può fornire diverse prospettive e metodi affidabili per studiare il meccanismo della mitofagia. La combinazione di modelli animali di malattia con sistemi di imaging mitofagia in vivo è utile per rivelare l'eziologia e la progressione delle malattie e facilitare la ricerca traslazionale.

La mitofagia svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi e delle funzioni cellulari.

Secondo le ricerche più recenti, è interessante notare che i protocolli originali basati sulla depolarizzazione mitocondriale acuta causata da sostanze non bersaglio (come FCCP) sono stati gradualmente affinati in strategie "più lievi" (come l'antimicina A e l'oligomicina) destinate a promuovere la mitofagia in un modo più in linea con le esigenze fisiologiche. Di conseguenza, è necessario progettare nuovi metodi farmacologici per manipolare la mitofagia e sviluppare farmaci per attivare selettivamente la mitofagia senza interferire con altri organelli. Con l'aiuto di nuove rivelazioni, questo processo di ricerca di nuovi modulatori può essere basato sullo screening fenotipico, sulla progettazione razionale di farmaci basata su specifiche proteine bersaglio o sulla scoperta accidentale basata su prodotti naturali. Inoltre, la tecnologia di intelligenza artificiale (AI) può anche essere utilizzata per aumentare la scoperta di farmaci. Un migliore utilizzo delle moderne tecnologie di analisi contribuirà molto alla ricerca futura e alla convalida di vari farmaci. Ad esempio, recentemente, un team di ricerca ha condotto uno screening virtuale dei farmaci attraverso la tecnologia AI e ha trovato con successo due piccole molecole naturali, kaempferol ed emodina, con evidente induzione mitofagia, che indicavano il loro potenziale per il trattamento dell'AD.[211](#). Vale la pena notare che in questo studio, i ricercatori hanno anche confrontato questo modello con altri metodi per determinare l'accuratezza di questo modello nell'identificazione degli induttori della mitofagia. I risultati mostrano che il modello di intelligenza artificiale utilizzato in questa ricerca è il più accurato e

i composti trovati con altri metodi non possono indurre la mitofagia nei neuroni. Inoltre, il tasso di successo del modello di intelligenza artificiale utilizzato è significativamente superiore a quello dello screening ad alto rendimento ed è superiore ad altri metodi di apprendimento automatico, relazioni quantitative struttura-attività (QSAR) e metodi assistiti da computer.

Le piccole molecole sono strumenti eccellenti per studiare e validare le implicazioni terapeutiche della mitofagia perché sono facili da gestire, agiscono rapidamente e sono per lo più reversibili [212](#). Tuttavia, una delle sfide principali è trovare piccole molecole che agiscono selettivamente sulla mitofagia. Pertanto, durante la progettazione di migliori modulatori della mitofagia, dovrebbe essere perseguito il targeting di percorsi mitofagici selettivi, che potrebbero aprire una finestra terapeutica più ampia. Proprio come applicare in modo accurato e ragionevole i modulatori dell'autofagia è ancora un problema difficile per questi farmaci a piccole molecole per entrare nell'applicazione clinica, anche l'applicazione accurata dei modulatori della mitofagia esistenti sarà una grande sfida in futuro. Pertanto, ci sono una serie di "punti di attenzione" che devono essere considerati quando si valutano le sonde chimiche mirate alla mitofagia. È fondamentale assicurarsi che le piccole molecole che scegliamo di utilizzare siano conformi alle linee guida raccomandate per lo sviluppo di composti di strumenti e sonde chimiche. Fortunatamente, il numero di queste sostanze chimiche è in continuo aumento. Da notare che, nel processo di rilascio di farmaci a piccole molecole o di rilascio di farmaci, alcuni nanomateriali possono essere utilizzati per aumentare il targeting mitocondriale e ridurre la tossicità, come le nanoparticelle di biossido di titanio (TiO₂-Nps) [213](#), nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro (SPIO-NPs) [214](#), nanoparticelle di ossido di zinco (ZnO-Nps) [215](#) e nanoparticelle di silice mesoporosa (MSNP) [216](#). L'uso di nanomateriali per promuovere il trasporto di piccole molecole che prendono di mira i mitocondri è anche un metodo potenziale ed efficace per ridurre gli effetti off-target di alcuni modulatori di piccole molecole. In futuro, rimane ancora molto lavoro da fare per scoprire nuovi nanomateriali di ogni tipo mirati alla mitofagia. E come esercitare i vantaggi della nanotecnologia nella somministrazione di farmaci attraverso una progettazione ragionevole, costruire nanocarrier ideali e forma di dosaggio e sviluppare nano-farmaci con carico ad alta efficienza, arricchimento specifico del tumore e rilascio controllato sono i problemi chiave che aspettano di essere risolti.

Poiché la mitofagia è necessaria per controllare l'omeostasi metabolica o rimuovere i mitocondri danneggiati o non necessari, previene il malfunzionamento mitocondriale e i successivi eventi molecolari, come lo stress ossidativo, che portano allo sviluppo della malattia. La mitofagia può prevenire l'aggregazione mitocondriale danneggiata e indurre azioni protettive contro la morte cellulare. La rilevanza centrale della mitofagia in tutte le malattie legate al controllo metabolico è ormai ben consolidata. Negli stati patologici, la mitofagia a volte può compensare parzialmente altri deficit alleviandoli, ma quando l'attività mitocondriale è compromessa, la mitofagia può effettivamente svolgere un ruolo dannoso. La mitofagia è un

meccanismo omeostatico centrale coinvolto nel turnover dei mitocondri danneggiati e disfunzionali generati a seguito di danno cellulare o processi associati alla malattia. La ricerca sui mitocondri è recentemente progredita. Indagini di processi come la mitofagia e il ruolo del mtDNA nelle malattie mitocondriali hanno aperto nuove aree di ricerca. Prove recenti indicano che la funzione mitocondriale è monitorata a vari livelli negli stati sani e patologici e che i segnali mitocondriali, in particolare quelli indotti dalle risposte allo stress, possono avere effetti drammatici sulle vie ossidative e biosintetiche nella cellula e possono persino influenzare il metabolismo di tutto il corpo. Un tema comune è che il mtDNA, la dinamica mitocondriale e lo stesso controllo di qualità possono essere responsabili di alterazioni del metabolismo mitocondriale e dei fenotipi della malattia. Tuttavia, è solo l'inizio della comprensione della complessità di questo organello. La comunicazione interorganellare tra mitocondri e organelli diversi dall'ER non è molto ben compresa. Nell'ultimo decennio, la consapevolezza che gli organelli interagiscono in modo fisico e funzionale ha aperto nuove aree di ricerca con importanti implicazioni per la comprensione di diverse malattie. Recenti scoperte che evidenziano l'interazione fisica e funzionale tra mitocondri e lisosomi suggeriscono che questa diafonia gioca un ruolo importante nella regolazione metabolica. Malgrado tutto ciò, molte domande fondamentali rimangono senza risposta. Sia i mitocondri che i lisosomi sono stati studiati in modo indipendente per il loro ruolo nella regolazione di amminoacidi e lipidi, ma come questi processi siano coordinati e integrati rimane una questione aperta. Dati i legami stretti tra mitocondri e lisosomi nella malattia, queste sono aree importanti che resta fondamentale da esplorare attraverso quali meccanismi i mitocondri interagiscono con altri organelli, sia in circostanze fisiologiche che patologiche e quale è il contributo degli altri organelli alla patologia delle malattie mitocondriali. I meccanismi attraverso i quali i mitocondri comunicano con le reti di segnalazione cellulare sono stati oggetto di attenzione per molti anni.

Sebbene recentemente ci siano stati significativi progressi nella conoscenza della mitofagia selettiva, molte domande rimangono senza risposta. Le vie di segnalazione PINK1-Parkin svolgono ruoli critici nella mitofagia in cellule/tessuti che hanno alti livelli di espressione di Parkin, come nel cervello del topo, nel timo, nei reni e nei muscoli. Tuttavia, le cellule che hanno livelli bassi o non rilevabili di Parkin possono utilizzare percorsi mitofagici parkin-indipendenti.

Lo studio dei composti che modulano l'autofagia e la mitofagia aiuterà nel trattamento di varie malattie causate dall'aggregazione e dalla modificazione ossidativa delle proteine all'interno delle cellule. Come con la maggior parte delle terapie che controllano un processo biologico, l'aumento dei livelli di mitofagia deve essere attentamente controllato perché il superamento di un limite superiore indurrebbe la morte cellulare, quindi un'attenta modulazione piuttosto che un'attivazione costitutiva sarebbe ideale per questo stile di trattamento. Ciò è particolarmente evidenziato nelle malattie in cui la normale attività della mitofagia è compromessa da eventi genetici o regolatori. Questi risultati hanno potenziato la ricerca farmacologica nel campo, poiché ci sono diversi bersagli lungo il percorso della mitofagia. Diversi composti alimentari naturali, come polifenoli, flavonoidi, trealosio, ripristinano i normali flussi mitofagici. Inoltre, altri processi mitocondriali tra cui la regolazione della biogenesi mitocondriale, il processo di degradazione selettiva dei mitocondri difettosi tramite la mitofagia, e la comunicazione interorganellare tra mitocondri e lisosomi è sempre più considerata vitale per la respirazione cellulare e la produzione di energia. Il fatto che questi processi siano o meno regolati anche dai cambiamenti sottostanti nell'integrità del mtDNA sarà probabilmente un'affascinante nuova area di indagine nei prossimi anni.

Il meccanismo della risposta allo stress è recentemente diventato al centro di molta attenzione grazie all'identificazione del fattore di trascrizione EB come principale regolatore del metabolismo energetico cellulare. Il TFEB fosforilato viene trattenuto nel citoplasma e successivamente si trasloca nel nucleo dopo la defosforilazione. Numerosi studi precedenti hanno dimostrato che la fosforilazione del TFEB citoplasmatico lo mantiene nel citoplasma, dove è inattivo. La localizzazione subcellulare di TFEB è stata proposta per essere immediatamente accoppiata con le sue funzioni cellulari. TFEB è emerso come il controllore dell'autofagia e della biogenesi dei lisosomi, con capacità di sovraregolare centinaia di geni coinvolti nel riciclaggio intracellulare, nel catabolismo, nei processi metabolici e nell'omeostasi cellulare. Il TFEB è anche necessario per indurre l'espressione di geni di risposta alla fame coinvolti in diversi passaggi del catabolismo lipidico che si verificano in diversi compartimenti cellulari come l'ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri. L'attivazione del TFEB sembra fondamentale per il controllo e anche l'espressione dei geni chiave coinvolti nella modulazione efficiente della funzione mitocondriale nei muscoli, del metabolismo lipido nel fegato, della risposta proteica spiegata, dell'apoptosi e della risposta immunitaria nei macrofagi, rivelando le sue ampie funzioni. In quanto importante fattore di trascrizione che regola l'omeostasi cellulare e la patogenesi corporea, il TFEB ha attirato molta attenzione in vari campi a cui è stato attribuito il suo sistema di funzione di trascrizione. La comprensione del ruolo del TFEB ha contribuito a fornire informazioni sui meccanismi coinvolti nella risposta cellulare alle condizioni ambientali, come la carenza di nutrienti. Il ruolo di questo fattore di trascrizione nell'adattamento cellulare a un'ampia varietà di stress interni e fluttuazioni ambientali è indissolubilmente legato alla sua capacità unica di regolare globalmente il sistema autofagico/lisosomiale. Inoltre, il ruolo principale di questo fattore di trascrizione potrebbe essere specifico del tipo cellulare.

L'identificazione del TFEB come regolatore globale dei geni coinvolti nel percorso lisosomiale-autofagico ha fornito nuove informazioni sul ruolo terapeutico del TFEB. Il TFEB è un obiettivo terapeutico interessante grazie al suo coinvolgimento nella coordinazione dell'induzione dell'autofagia con la biogenesi lisosomiale. Queste malattie potenzialmente traggono vantaggio dalla promozione della funzione del lisosoma e dell'autofagia, per cui la modulazione dell'attività del TFEB rappresenta un obiettivo terapeutico valido con promettente rilevanza nel campo terapeutico. La capacità di TFEB di rilevare lo stress cellulare e mediare il ripristino dell'omeostasi lo rende candidato ideale per strategie palliative destinate alle malattie umane. Questo interesse è ulteriormente rafforzato dall'osservazione che diversi tipi di stress, tra cui limitazione dei nutrienti, accumulo di proteine aberranti, danno mitocondriale e infezioni inducono l'attivazione di TFEB.

Con il continuo approfondimento della ricerca in biologia molecolare, sono stati compresi in una certa misura vari meccanismi che regolano il TFEB e i farmaci mirati. Sebbene sia stato segnalato che alcuni prodotti naturali attivano il TFEB e migliorano i fenotipi, le loro proprietà molecolari, il complesso meccanismo e la mancanza di prove sperimentali cliniche limitano il loro ulteriore sviluppo. Finora, è stato riportato che alcuni prodotti non naturali possono attivare il TFEB, tra cui rapamicina, fubendazole. Lo studio del ruolo e degli agonisti del TFEB a piccole molecole nelle malattie potrebbe aiutare gli studi sulla biologia del TFEB e potrebbero fornire una nuova prospettiva per lo sviluppo di nuovi farmaci e promuovere strategie farmacologiche per il trattamento delle malattie mitocondriali. Infatti, l'intervento farmacologico di bersagli a monte della via TFEB-autofagia, come gli inibitori di mTORC1 e gli attivatori di AMPK, hanno già dimostrato di essere molto promettenti per invertire le anomalie e persino per prolungare la durata della vita. Inoltre, la scoperta di attivatori TFEB clinicamente disponibili potrebbe essere una strategia promettente per il trattamento delle

malattie associate alla disfunzione della via autofagia-lisosoma. E senza dubbio migliorerebbero la comprensione della complessa regolazione dell'adattamento cellulare allo stress. L'identificazione di nuovi attivatori chimici che prendono di mira la funzione del TFEB suggerisce che il TFEB sia un bersaglio farmaceutico.

Il transgene TFEB è neuroprotettivo promuovendo la clearance degli aggregati proteici neurodegenerativi. L'espressione esogena di TFEB stimola la biogenesi lisosomiale. Gli attivatori di piccole molecole di TFEB con una penetrazione cerebrale soddisfacente e una bassa tossicità hanno un grande potenziale per il trattamento dei disturbi neurodegenerativi. L'attività del TFEB può essere modulata nel cervello attraverso la sovraespressione virale o genetica, ottenendo un significativo miglioramento dei fenotipi patologici e comportamentali in numerosi e vari modelli animali di malattie neurodegenerative. La modificazione genetica del TFEB ha mostrato effetti di protezione in diversi modelli di malattie animali. L'attivazione sperimentale della rete CLEAR in modelli molti diversi di malattie degenerative da accumulo ha costantemente portato a miglioramenti fenotipici negli organi colpiti e persino nell'allungamento della durata della vita. E' significativo che molte di queste malattie non abbiano attualmente opzioni terapeutiche diverse dalle cure palliative.

Soltanto recentemente si è iniziato a comprendere il contributo di TFEB alla risposta cellulare allo stress. Questo fattore di trascrizione sembra anche mediare la comunicazione tra il lisosoma e il nucleo nella risposta adattativa a segnali ambientali come la disponibilità di nutrienti. Sulla base dei precedenti studi strutturali di TFEB, la dimerizzazione di TFEB a lunghezza è molto probabilmente causata dal dominio bHLH che può formare un dimero a spirale. Il TFEB è un fattore di trascrizione bHLH-Zip e la sua attività e localizzazione subcellulare sono dipendenti dal livello di fosforilazione del TFEB.

Nonostante i notevoli progressi compiuti, diverse domande rimangono senza risposta. La relazione e l'interdipendenza tra questi eventi di fosforilazione non sono ancora chiarite. Resta inoltre da stabilire se la localizzazione subcellulare del TFEB, in un contesto fisiologico, può essere modulato da meccanismi indipendenti dalla fosforilazione. Un altro punto importante da affrontare è come, una volta nel nucleo, il TFEB viene esportato nel citoplasma e se i meccanismi di esportazione nucleare del TFEB aggiungono un altro livello di regolazione della funzione del TFEB. Trovare le risposte a queste e ad altre domande critiche sarà di fondamentale importanza per la futura comprensione dei meccanismi trascrizionali che regolano il metabolismo cellulare in risposta all'ambiente e può portare allo sviluppo di potenti strumenti per modulare questi percorsi nelle malattie umane. Tuttavia, il preciso meccanismo molecolare dell'attivazione di TFEB e di degradazione cellulare essenziale, il livello e la durata dell'attivazione della via dell'autofagia-lisosoma e TFEB non sono ancora ben definiti. Man mano che il ruolo dei lisosomi e dell'autofagia nel metabolismo delle macromolecole diventa più chiaro, il potenziamento di questo meccanismo innato di clearance cellulare, come gli agonisti del TFEB, offre una nuova strategia terapeutica per il trattamento di queste malattie. Resta da chiarire il meccanismo inequivocabile della sua attività. Sebbene la modifica post-traduzionale sia considerata il modo principale per regolare l'attività del TFEB e la localizzazione intracellulare, attualmente solo la modifica della fosforilazione ha ricevuto ricerche approfondite, mentre gli altri potenti meccanismi di regolazione, come l'acetilazione, la SUMOilazione e l'ubiquitinazione devono essere esplorati. E' anche necessario determinare i siti particolari delle modifiche post-traduzionali che regolano la funzione TFEB, che è anche impegnativa. Un altro enigma importante da risolvere è come il TFEB una volta entrato nel nucleo viene trasportato di nuovo nel citoplasma e se i meccanismi di esportazione nucleare del TFEB aggiungono un altro livello di regolazione della funzione del TFEB. Comunque, la ricerca attuale si limita solo al livello di trascrizione e al livello proteico e si concentra

principalmente sulla defosforilazione del TFEB che entra nel nucleo e ne aumenta. Sono necessari ulteriori lavori per determinare come viene attivato TFEB. Gli studi sulle modifiche post-traduzionali di TFEB nella salute e nella malattia possono far luce sulla funzione del TFEB e potrebbero produrre strategie interessanti per lo sviluppo della terapia. Lo sviluppo di piccole molecole che modulano l'attività di TFEB in modo accurato temporale e tessuto-specifico è un'area gratificante per studi futuri. Nonostante i notevoli progressi compiuti verso la comprensione di come le vie di segnalazione regolano la localizzazione e la funzione subcellulare del TFEB attraverso la fosforilazione di specifici residui di serina, diverse domande critiche rimangono senza risposta. E' stato scoperto che il TFEB è fosforilato da diverse chinasi. Tuttavia, la relazione e l'interdipendenza di questi eventi di fosforilazione non sono ancora chiare. Resta inoltre da stabilire se la localizzazione subcellulare del TFEB, in un contesto fisiologico, può essere modulato da meccanismi indipendenti dalla fosforilazione. Un'ulteriore comprensione della rete trascrizionale mediata da TFEB sarebbe estremamente utile. Numerosi studi hanno dimostrato che il miglioramento della clearance intracellulare può alleviare i sintomi associati a una varietà di malattie. I progressi nella ricerca sulle proteine TFEB hanno portato a una migliore comprensione della funzione, dei meccanismi regolatori e dei percorsi influenzati da questo fattore di trascrizione.

Sebbene finora non siano stati utilizzati attivatori TFEB nella clinica, alcuni farmaci già in uso hanno effetti sull'attivazione di TIFEF. Se i loro effetti farmacologici sono in parte correlati all'attivazione di TFEB è degno di ulteriori studi. Nel complesso, si deve usare cautela durante l'uso degli attivatori TFEB per il trattamento della malattia.

la scoperta di attivatori TFEB clinicamente disponibili può essere una strategia promettente per il trattamento delle malattie associate alla disfunzione ALP.

La rilevanza di TFEB/TFE3 per le malattie umane non è meno critica. L'attivazione di questi fattori di trascrizione sembra benefica in molti disturbi neurologici e lisosomiali, ma può conferire un vantaggio adattativo alle cellule tumorali. Lo sviluppo di piccole molecole che modulano l'attività di TFEB/TFE3 in modo accurato temporal-specifico e tissutale è un'area gratificante per studi futuri. Queste molecole hanno il potenziale per essere utilizzate per una pletora di malattie umane, compresi i disturbi metabolici, immunitari, neurologici e oncogeni, e senza dubbio migliorerebbero la nostra comprensione della complessa regolazione dell'adattamento cellulare allo stress.

In conclusione, esiste la possibilità che la modulazione TFEB possa ritardare la degenerazione degli organi e prevenire le malattie cardiache attraverso il ripristino dell'autofagia funzionale.

La capacità di TFEB e TFE3 di rilevare lo stress cellulare e mediare il ripristino dell'omeostasi li rende candidati ideali per strategie palliative destinate alle malattie umane. Tuttavia, il preciso meccanismo molecolare dell'attivazione di TFEB/TFE3 non è ancora ben definito; Chiarire questo processo farà luce sulla nostra attuale comprensione dell'importante ruolo svolto da questi fattori di trascrizione nel meccanismo ben orchestrato adottato dalle cellule per rispondere e adattarsi allo stress.

L'aumento dell'autofagia, o più specificamente la mitofagia, potrebbe servire come un obiettivo prezioso per una certa popolazione di pazienti con malattie mitocondriali

Le malattie mitocondriali sono un termine per disturbi mitocondriali primari e rappresentano un gruppo di disordini geneticamente ereditari dalla madre e clinicamente eterogenei, cronici, caratterizzati da difetti della fosforilazione ossidativa (OXPHOS) (...). Dato che i mitocondri sono importanti per la produzione di energia attraverso i complessi OXPHOS, l'insufficienza energetica è innescata dalle mutazioni dei geni mitocondriali codificati nel nucleo e DNA mitocondriale che possano portare a disfunzione mitocondriale (...). Questi disturbi possono colpire un individuo a ogni età. I tessuti e gli organi che sono più spesso colpiti sono quelli con le più alte esigenze energetiche del corpo- nervi, il cervello e altri organi principali (...). In generale, la disfunzione mitocondriale può verificarsi come una vasta gamma di sintomi clinici che vanno da miopatie con una insorgenza relativamente benigna e ad esordio tardivo, a encefalopatie estremamente gravi e ad esordio precoce e gravi cardiomiopatie (...) e contribuisce al coinvolgimento multiorgano (...). Non è attualmente disponibile alcuna cura o terapia efficace per le malattie mitocondriali, anche se studi recenti hanno mostrato un potenziale beneficio di diversi approcci, almeno in preclinica in vivo modelli (...). Data l'eterogeneità clinica, biochimica e genetica delle malattie mitocondriali e la rarità delle singole sindromi, sarebbero preferibili approcci terapeutici con ampia applicabilità, ma questo è un compito difficile da raggiungere (Viscomi *et al*, [2015](#)).

Materiali e Metodi

2.1. Materiali utilizzati

Terreno per le cellule

FBS, siero fetale bovino

CEE, estratto embrionale di pollo

BSA, albumina sierica bovina

PBS, soluzione salina tamponata con fosfato

EDTA

Penicillina 100X

Streptomicina 100X

Isopropanolo

Tripsina

DMSO

Amfotericina, antifungino

DPBS

Trizol

Etanolo

Collagenasi caspasi

Poli-Di-Lisina

Colorante Blu

FGF, Fattore di crescita dei fibroblasti basico 1000X

Rapamicina

FCCP 1000X-cianuro di carbonile 3-clorofenilidrazone

Oligomicina 1000X

Torin1, inibitore di mTOR

Metanolo

DPBS

Siero di capra

Anticorpi primario e secondario (anticoepo secondario anti-GFP policlomale di coniglio, anti-TFEB policlonale di coniglio)

Olio

Curcumina, derivato C1

mcherry

EGFP, proteina fluorescente verde potenziata

DAPI (INVITROGEN)

FUGENE

DMEM, GIBCO

H₂O

Cloroquina

MYC-sequenza amminoacidica

Anticorpo anti-GFP di coniglio, policlonale

Anticorpo coniglio policlonale anti-TFEB

2.1. Metodi

2.1.1. Coltura cellulare 3T3

I fibroblasti sono le cellule predominanti del tessuto connettivo e normalmente producono componenti della matrice extracellulare (ECM) come il collagene, che si lega alle molecole di adesione cellulare, in modo di far aderire le cellule ad una superficie. In coltura i fibroblasti si dividono più velocemente rispetto ad altre cellule di un tessuto, diventando alla fine il tipo cellulare predominante di una coltura primaria.

I tessuti intatti sono la fonte di materiale che più corrisponde alla realtà, in quanto rappresentano le cellule che effettivamente si trovano all'interno del corpo. Le colture preparate direttamente dai tessuti di un animale normale si chiamano colture cellulari primarie. Il primo passaggio nell'isolamento di cellule singole è quello di disgregare la matrice extracellulare e distruggere le giunzioni tra le cellule e le cellule con la matrice che tengono insieme le cellule. Per ottenere questo risultato frammenti di tessuto muscolare dal campione (topi adulti WT sacrificati) sono trattati tramite taglio con le forbici con l'enzima proteolitico la collagenasi di tipo II, per disgregare il muscolo e digerire le proteine della matrice extracellulare. Inizialmente la collagenasi è stata pesata, filtrata, perché va sciolta alla fine nel terreno che è sterile. I muscoli trattati fisicamente sono stati versati in tubo di vetro e va aggiunta la collagenasi. Sono stati lasciati a riposo a 37 °C per 30 minuti. Si aspira il liquido nel quale si trovano i muscoli. Dopo che sono passate 30 minuti è stata fatta nuova centrifugazione e è stata eliminata la collagenasi II. Il campione è stato diluito con l'aggiunta di volume di terreno, perché la collagenasi continua a lavorare, se si fa diluizione non lavora. Si centrifuga per 3 minuti a 500rpm. La prossima collagenasi che è stata impiegata è infatti un mix che permette di distaccare le cellule dal tessuto muscolare. Entrambe le collagenasi agiscono a 37°C. Durante la centrifugazione si preparano la collagenasi e il buffer. È stata pesata la BSA. La quantità pesata di BSA è stata messa in una provetta di vetro da 15 ml. Sono 250 mg di BSA in 5 ml di PBS, la concentrazione è circa 5%. Questa soluzione è stata vortexata, perché BSA è schiumogena. Si prepara il mix. La collagenasi-caspasi va messa nel buffer. E poi si filtra. Per preparare il buffer sono stati necessari 2 ml di BSA, 2 ml di EDTA e 16 ml per arrivare al volume finale di PBS. EDTA è stato aggiunto perché è chelante degli ioni bivalenti il Ca^{2+} e il Mg^{2+} dai quali dipende l'adesione cellula-cellula. Al muscolo appena ottenuto come pellet sul fondo, delicatamente è stata assorbita la fase liquida nella quale si trova la collagenasi che è stata scartata. Al muscolo rimasto è stato aggiunto il mix che contiene la collagenasi caspasi. Sono stati mescolati e per 10 minuti lasciati in blanda agitazione. Il tessuto così si è dissociato in singole cellule. Successivamente il pellet è stato risospeso, perché ci sono pezzi grossi che devono essere disgregati. Prima con puntale P5 e poi con P1000. È stata fatta filtrazione con filtri di 70 e 40 μ . Dopo di nuovo centrifugazione per 10 minuti a 12000rpm (numero di giri per minuto). Dopo la centrifuga di nuovo è stata aspirata la parte liquida e buttata. Le cellule stanno nel pellet. A questo pellet è stata aggiunta una mix di anticorpi legati a un gruppo magnetico (coniugati con il magnete) e il pellet è stato risospeso bene con il buffer contenente

gli anticorpi. Questa operazione è stata fatta al buio sotto capa. I tubi di vetro sono stati avvolti in stagnolo e sono stati messi in frigorifero per 15 minuti. In questo modo gli anticorpi si legano alle cellule. Nel frattempo sono state preparate le collonine. Sono state riempite con un liquido- buffer di 3 ml. Queste collonine funzionano soltanto quando sono riempite completamente. Ai 48 μ l di terreno fatto prima sono stati aggiunti 1,5 μ l di siero di pollo. E sono mescolati. Poi si filtrava il terreno. Al pellet con gli anticorpi stato aggiunto il buffer di PBS, BSA, EDTA, che ha il pH giusto per la reazione. Sono stati messi due provette di vetro da 15 ml che sono per PBS anche e d è stato aggiunto il mix contenente cellule e anticorpi con il buffer nelle collonine e si è aspettato l'eluato nelle provette. Si deve aggiungere il buffer, mentre le cellule di non interesse sono attaccate ai magneti. Con un pistone si schiacciava e il buffer aggiunto da 3 ml è andato dentro con tutto il resto rimasto sulle collonine. Poi le provette sono state messe in centrifuga. Le cellule sono diluite. E' stato aggiunto il terreno liquido (DMEM, mezzo di Eagle modificato di Dulbecco), contenente 10% siero bovino fetale (FBS), che contiene diversi fattori proteici necessari per la proliferazione delle cellule di mammifero in coltura e si è rissospeso il pellet. Tutto è stato trasferito in piastre di plastica. La maggior parte delle cellule isolate da animali cresce soltanto su una superficie solida. Poi le piastre sono state mosse un'po con movimenti circolari e così le cellule si distribuiscono. Alla fine le cellule sono state trasferite in incubatore, dove sono mantenute a temperatura di 37 °C , in ambiente umido ed in presenza di 5% di CO₂. Le cellule animali isolate possono aderire sia alla superficie sia l'una con l'altra. La stessa soluzione contenente le proteasi e il chelante viene utilizzata per rimuovere le cellule adese su una piastra di coltura, da utilizzare per studi biochimici o per mantenere una coltura secondaria (trasferimento in un'altra piastra). Per ridurre la possibilità di contaminazioni batteriche o fungine, sono stati aggiunti degli antibiotici nel mezzo di coltura, penicillina 100 U/ml e Streptomycina 100 μ grammi/ml. Entrambi gli antibiotici sono concentrati 100X e sono miscela di 1% e 1% di aminoacidi non essenziali. Per proteggere ulteriormente le cellule nelle culture primarie dalle contaminazioni, sono state trasferite spesso le cellule dalla piastra di coltura e coltivate di nuovo in nuove piastre di coltura, sono le cosiddette colture secondarie, in questo modo possono essere subcoltivate più volte per settimane o mesi.

Le colture cellulari ottenute dissociando i tessuti tendono a dover affrontare un problema: a un certo punto le cellule muoiono. La maggior parte delle cellule dei vertebrati cessa di dividersi dopo un numero finito di divisioni cellulari in coltura, un processo chiamato senescenza cellulare replicativa. I fibroblasti WT sono stati generati dopo l'immortalizzazione di fibroblasti primari con infezione retrovirale di SV40 large T che inibisce la proteina p53. I fibroblasti immortalati sono stati coltivati in Medium integrato con il 10% di FBS e l'1% di penicillina-streptomycina.

Le cellule HeLa sono state coltivate a 37°C nel mezzo di Eagle modificato (DMEM) di Dulbecco integrato con siero di vitello al 10%, GlutaMax, 2mM, penicillina (100 U/mL) e streptomycina (100 μ g/mL) (Gibco) in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Il volume del terreno va cambiato ogni due giorni e le cellule sono state coltivate per sette giorni.

Per generare linee cellulari 3T3 che esprimono stabilmente TFEB-EGFP o EGFP, particelle lentivirali contenenti costrutti p – hTFEB-EGFP-IRES- o p ~~EGFP~~PIRES- sono state prodotte in cellule Lenti- -293T utilizzando il protocollo.

TFEB umano con un tag Myc sono stati trasfettati in cellule HEK293.

2.1.2. Trattamento farmacologico delle cellule: induzione della mitofagia

Per gli esperimenti di traslocazione del TFEB e di mitofagia, le cellule sono state lasciate non trattate o trattate con Oligomicina e FCCP in terreno di crescita fresco. Il veicolo utilizzato per i composti farmacologici e come controllo è DMSO 0,1%. Il composto Torin1 è il controllo

positivo. FCCP e Oligomicina sono il controllo positivo. Oligomicina e FCCP bloccano la catena respiratoria mitocondriale. L'oligomicina è inibitore dell'ATP-sintasi. CCCP è l'induttore della mitofagia più comunemente usato nelle cellule dei mammiferi e si pensa che eserciti i suoi effetti riducendo il potenziale della membrana mitocondriale (Narendra D., et al., 2008). Per indurre la depolarizzazione della membrana mitocondriale le cellule fibroblastiche sono state trattate con 10 μ M di FCCP per 6 ore. Le cellule trattate con dimetilsolfossido (DMSO) a volume equivalente, sono usate come controllo negativo. Anche DMSO è tossico per le cellule.

Il trattamento delle cellule si fa con l'aspirazione del terreno in cui sono state coltivate le cellule, il lavaggio con il PBS. Si aggiungono i composti farmacologici alle concentrazioni previste e si aggiunge anche terreno.

Le concentrazioni degli agenti farmacologici sono state:

Rapamicina-200nM e 500nM.

Torin1-250nM e 500nM

Torin-1 è stato sciolto in DMSO a una concentrazione di stock di 1 mM

Curcumina C1-1 μ M e 500nM

Questi composti sono stati solubilizzati in DMSO, che è stato utilizzato come controllo del veicolo. E' stato aggiunto un disaccoppiatore, FCCP per far provocare una grave perdita del potenziale della membrana mitocondriale in pochi minuti e il seguito del reclutamento di parkin e LC3 nei mitocondri, insieme con il colasso del gradiente elettrochimico per consentire alla catena respiratoria di funzionare alla sua velocità massima e per prevenire l'acidificazione lisosomiale. E oligomicina per arrestare tutta la respirazione mitocondriale, perché è in grado di influenzare l'intera popolazione mitocondriale (Ashrafi G., et al., 2013).

2.1.3. Colorazione immunofluorescenza

Le cellule ed i tessuti vivi in genere mancano di composti che assorbono la luce e quindi sono quasi invisibili al microscopio ottico. I coloranti fluorescenti usati per colorare le cellule sono rivelati dal microscopio a fluorescenza. La microscopia a fluorescenza viene usata più spesso per rivelare proteine specifiche o altre molecole in cellule e tessuti. Le molecole fluorescenti assorbono luce a una lunghezza d'onda e la emettono a un'altra più lunga. Questo microscopio è simile a un microscopio ottico ordinario eccetto che la luce che illumina, proveniente da una fonte molto potente, passa attraverso due serie di filtri. Il primo filtro è selezionato in modo che lasci passare soltanto le lunghezze d'onda che eccitano il particolare colorante fluorescente, mentre il secondo filtro blocca questa luce e lascia passare soltanto quelle lunghezze d'onda emesse quando il colorante emana luce fluorescente. Se un composto di questo tipo viene illuminato alla lunghezza d'onda di assorbimento e quindi osservato attraverso un filtro che permette il passaggio della sola lunghezza d'onda di emissione, lo si vede risplendere contro uno sfondo scuro. Poiché lo sfondo è scuro, si può rilevare anche una minima quantità del colorante fluorescente.

La microscopia a fluorescenza convenzionale ha un grosso limite. In primo luogo, la luce fluorescente emessa da un campione proviene da molecole situate sopra e sotto il piano focale; quindi si vedrà un'immagine non a fuoco a causa della sovrapposizione delle immagini fluorescenti originate da molecole a profondità diverse nella cellula. La mancata messa a fuoco rende difficile la determinazione dell'effettiva disposizione delle molecole. La microscopia delle cellule vive richiede, inoltre, che le cellule vengano mantenute in recipienti con superfici di vetro, denominati camere di coltura, che possano essere montati su un supporto per microscopia. Prima si preparano e ricoprono i vetrini, che si raccolgono con l'aspirazione da bichierini, e poi si mettono le cellule. Dopo di che si aggiunge la poli-D-lisina che è la sostanza che serve prima del trattamento per attaccare le cellule. Servono circa 500 μ l di poli-D-lisina per ogni pozzetto. Dopo che è aggiunta si coprono i vetrini e vanno girati, così polilisina copre tutta la superficie, sono stati lasciati in riposo per 5 minuti. La poli-D-lisina è stata aspirata con pipetta e rimane uno strato sottile che è lasciato fermo per 20 minuti. È stato asciugato il sottile strato di Poli-D-lisina e così si solidifica e diventa inerte per le cellule. Dopo che sono stati passati i 20 minuti si aggiunge PBS a caso. I campioni per la microscopia vengono spesso fissati con una soluzione contenente agenti chimici che creano legami crociati nella maggiore parte delle proteine e degli acidi nucleici. Questi legami covalenti stabilizzano le interazioni proteina-proteina e proteina-acido nucleico e rendono le molecole insolubili e stabili per i trattamenti successivi.

Ai fibroblasti dopo i trattamenti con le sostanze farmacologiche, è stato tolto il terreno con le concentrazioni delle sostanze. Per le cellule aderenti si aspira il terreno ed è stato aggiunto poco PBS. In questo modo sono state lavate le cellule. E poi si aspira. Sono state aggiunte 2 ml di tripsina per 5 minuti a 37°C. Le cellule cominciano pian piano di staccarsi. Si aggiungono almeno 2 ml di terreno di coltura. In questo modo è stata diluita la tripsina che comunque distrugge le cellule. 4 ml sono stati messi in centrifuga per 5 minuti a 500 g. Dopo la centrifugazione si sono formati 2 fasi- pellet e fase liquida. La tripsina si trova nella fase

liquida. Il surnatante è stato scartato. Alle cellule sono stati aggiunti 2 ml di terreno di coltura, e si risospesano bene. Sono stati prelevati 150µl di terreno con le cellule e sono stati aggiunti al terreno che sarà messo ai vetrini.

Dopo l'aspirazione di PBS dalle piastrelle con i vetrini sono stati aggiunti i fibroblasti che sono stati risospesi bene. 1 ml è stato messo per ogni vetrino. Servono 24 ore circa per attaccarsi. Nelle cellule rimaste di 2 ml è stato fatto un prelievo di 1:10, quindi 200µl e sono state mescolate e si mettono tutti in incubatore. Le cellule in coltura coltivate su vetrini coprioggetto sono abbastanza sottili da essere fissate in situ e osservate al microscopio. Per questi motivi, per rilevare le strutture subcellulari è stato necessario che le cellule siano fissate, sezionate e colorate. Le cellule sono state lavate 3 volte con PBS, successivamente sono state fissate con 1ml di formaldeide al 4% in PBS per ogni pozzetto. La formaldeide, un comune fissativo, crea legami crociati tra i gruppi amminoacidici di molecole adiacenti. Il trattamento è stato fatto per 10 minuti. Poi la formaldeide è stata lavata per 3 volte sempre con PBS. Il legame non specifico che si è creato tra i gruppi amminoacidici nelle cellule è stato bloccato con il siero di capra normale sciolto al 5% in PBS, per 1 ora.

Le cellule sono state lavate con PBS e fissate in piastre di Petri con formaldeide al 4% a temperatura ambiente per 30 minuti. Dopo la fissazione, le cellule sono state lavate due volte con PBS per 5 minuti. Le cellule sono state incubate in BSA in PBS per 1 ora e poi con anticorpo primario TFEB in BSA al % in PBS per ore a 37°C. Le cellule sono state lavate tre volte con PBS e incubate con i corrispondenti anticorpi secondari coniugati con Alexa Fluor 488 in BSA al 4% in PBS per 30 minuti a 37°C. Le cellule sono state lavate tre volte con PBS e incubate con DAPI (0,1µg/mL) in PBS per 15 minuti a temperatura ambiente. I piatti lavati con PBS sono stati coperti con coprioggetto e osservati con il microscopio Zeiss.

I vetrini sono stati sondati per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi primari specifici. Successivamente, i vetrini sono stati trattati con l'anticorpo secondario Alexa Fluor per 1 ora a temperatura ambiente. Infine, i vetrini sono stati lavati con colorazione dei nuclei di 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) (1:500) per 15 minuti. I vetrini montati sono stati visualizzati con un microscopio a fluorescenza dotato di obiettivo di immersione x40. E un microscopio confocale dotato di immersione in olio x40. Tutte le immagini sono state scattate con la stessa esposizione per condizione.

La tappa finale di preparazione di un campione per la microscopia è la colorazione, che permette di visualizzare le principali caratteristiche strutturali della cellula. I coloranti si legano alle molecole che hanno specifiche caratteristiche. Per la colorazione del TFEB le cellule sono bloccate con la soluzione al 4% fatta da BSA solida sciolta in PBS e l'aggiunta dell'anticorpo monoclonale primario (300µl, diluizione 1:300) anti-LC3B applicato ai fibroblasti in questa soluzione. Questo trattamento ha la durata di 1 ora. L'anticorpo primario non è sensibile alla luce e si lega al fattore di trascrizione nel nucleo. Dopo l'incubazione con gli anticorpi primari le cellule sono state di nuovo lavate con PBS per 3 volte. Con l'aggiunta di un altro anticorpo che si lega al primo si visualizza questo fattore di trascrizione al microscopio, si ottiene un segnale più forte usando un anticorpo primario non marcato e rivelandolo quindi con un gruppo

di anticorpi secondari di capra anti-coniglio marcati che si legano a esso. La soluzione per l'anticorpo secondario è fatta da BSA e PBS al volume totale di 5ml. Quindi 10µl di anticorpo secondario sono stati sciolti in 5ml di soluzione di BSA in PBS. In ogni pozzetto 500µl della soluzione sono stati versati, diluizione 1:500, a riposo per 1 ora. Gli anticorpi secondari sono stati accoppiati ad Alexa Fluor 488 e 568. La fluorescenza rossa è rilevabile a 568 nm, la fluorescenza verde è rilevabile a 488 nm. Tutto ricoperto in foglio di alluminio essendo l'anticorpo secondario sensibile alla luce, poiché è marcato con un fluorocromo che si lega alla porzione costante (Fc) del primo anticorpo. Successivamente le cellule sono state colorate con DAPI (Invitrogen), utilizzato per la colorare i nuclei (1:10000 in PBS). Durante gli esperimenti di immunofluorescenza non sempre è stata utilizzata la Formaldeide, ma anche il metanolo 100% per il fissaggio delle cellule, per 20min, in ghiaccio. Le cellule sono state colorate per esaminare la traslocazione nucleare di TFEB seguite da colorazione nucleare con DAPI (Invitrogen) e rilevate con Alexa Fluor mirato a IgG di coniglio. Per poter visualizzare LC3A/B puncta.

Le immagini di fluorescenza sono state ottenute su un microscopio confocale a scansione laser con un obiettivo di immersione in olio di 40X1,3, cioè si mette olio tra l'obiettivo e il vetrino. Microscopio a scansione laser confocale Zeiss. Quando si doveva valutare la mitofagia.

Le cellule HEK293 sono state placcate su vetrini coprioggetto di vetro rivestiti di fibronectina in piastre di coltura. Dopo 12-16 ore le cellule sono state trasfettate con TFEB – MYC. Le cellule sono state immunomarcate con anticorpi primari MYC in un rapporto 1:100, rabbit anti-TFEB in un rapporto 1:300 e 1:500 PBS in BSA 4% e 1% siero di capra. Le cellule di controllo non sono state trasfettate con TFEB né con la sequenza MYC. Le concentrazioni sono 1:100 per MYC e 1:300 per il TFEB. Dopo il lavaggio, le cellule sono state incubate con un corrispondente anticorpo secondario Alexa Fluor 488 e 647 in BSA all'1% per un ora al buio a 37°C. I nuclei sono stati colorati con DAPI per 5 minuti a temperatura ambiente. I segnali fluorescenti sono stati esaminati utilizzando un microscopio a fluorescenza. Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale Leica con obiettivo 40x. Per l'analisi di quantificazione sono stati utilizzati almeno tre vetrini coprioggetto per ogni replica biologica per gruppo e più aree per vetrino selezionato su base casuale.

2.1.3. Microscopia Confocale

La microscopia confocale, differisce dalla microscopia a fluorescenza convenzionale per l'utilizzo di un foro localizzato davanti al rivelatore che blocca la luce non proveniente dal piano focale. Il microscopio confocale è generalmente usato con ottiche a fluorescenza, ma invece di illuminare l'intero campione in una volta sola, nel solito modo, il sistema ottico mette a fuoco in ogni istante una macchia di luce su un singolo punto a una profondità specifica nel campione. Si utilizza un fascio di luce laser come sorgente di illuminazione. I laser forniscono una lunghezza d'onda di eccitazione definita e a causa della loro energia focalizzata sono spesso molto adatti per penetrare attraverso campioni. Il detector deve essere allineato con la luce che arriva dopo che è stato eccitato EGFP a 488nm. Intorno a 560 nm si emette una luce verde. Essendo microscopio confocale permette di vedere l'intensità della luce da un solo piano e non da tutto il cubo. Per costruire un'immagine bidimensionale la fluorescenza emessa dal materiale illuminato è raccolta in modo che essa formi un'immagine su un rivelatore di luce adatto, i dati di ciascun singolo punto del piano di fuoco del campione sono raccolti sequenzialmente mediante scansione del campo da sinistra a destra (trasversalmente e sagittalmente) in uno schema regolare di pixel e sono visibili sul monitor di un computer. L'immagine che ne risulta non viene offuscata dalle strutture al di sopra e al di sotto della posizione corrente del piano focale. Un'apertura minuscola è posta davanti al rivelatore, in una posizione che è confocale rispetto al forellino di illuminazione, cioè precisamente dove i raggi emessi dal punto illuminato nel campione sono messi a fuoco. Così la luce da questo punto del campione converge in questa apertura ed entra nel rivelatore. L'intensità della luce proveniente da queste aree a fuoco viene registrata da un tubo fotomoltiplicatore, e l'immagine viene memorizzata in un computer. Il procedimento di esposizione è durato 10 minuti e quindi non è adatto per visualizzare i processi biologici veloci negli organismi vivi. L'intervallo delle foto z-stack è $0,3\mu\text{m}$ a $0,30\mu\text{m}$ che è l'intervallo tra una foto e l'altra. L'obiettivo di immersione in olio è 40X1,3, questo significa che si mette olio tra il vetrino e l'obiettivo del microscopio, si fa a luce spenta. La luce proveniente da regioni fuori dal piano del fuoco del punto luminoso è invece fuori fuoco a livello dell'apertura del forellino ed è perciò in gran parte esclusa dal rivelatore. Tutte le immagini vengono visualizzate come proiezioni massime dello stack z. Si fa valutazione mediante analisi del profilo nei piani z confocali. Tutti i campioni sono stati ripresi in 3D mediante sezionamento ottico utilizzando un microscopio a scansione laser confocale dotato di un obiettivo x40

Mcherry-rosso

EGFP-verde

EGFP è stato eccitato da un laser a diodi da 488 nm e la fluorescenza è stata rilevata nell'intervallo di lunghezze d'onda di 500-540 nm. Mcherry è stato eccitato da un laser a diodi da 561 nm e la fluorescenza è stata rilevata nell'intervallo di lunghezze d'onda di 570-620 nm.

GFP (proteina fluorescente verde) è la principale fra le proteine fluorescenti usate per la microscopia. Questa proteina è codificata da un singolo gene che può essere clonato e introdotto in cellule di altre specie. La proteina appena tradotta non è fluorescente, ma nel giro di un'ora circa subisce una modificazione post-traduzionale autocatalizzata che genera un

centro fluorescente efficiente e brillante, schermato all'interno da una proteina a forma di barile, che sarà fluorescente quando illuminata appropriatamente con luce blu.

DAPI-blu

con il verde e il rosso si modela, si deve arrivare fino alla metà della retta. Il verde sono i mitocondri, il rosso sono i mitocondri degradati dalla cellula. 647 nm è la lunghezza d'onda per il rosso lontano, con il quale si visualizza il TFEB. L'analisi confocale è stata eseguita con un microscopio confocale Leica. Le immagini sono state scattate ogni 0,2µm e le analisi del profilo sono state eseguite su piani confocali utilizzando il software Leica Application Suite X. L'intensità nucleare del TFEB è stata misurata utilizzando il software. Per ogni trattamento sono state analizzate 100 cellule ed è stato misurato un valore di intensità per nucleo.

Le cellule fibroblastiche GFP-TFEB trattate con composti o DMSO sono state fissate e colorate.

Le immagini provenienti da almeno tre diversi campi per campione sono state acquisite utilizzando un obiettivo di immersione in olio 40X1,3 su un microscopio confocale Zeiss e analizzate. Dopo il trattamento, le cellule sono state fissate in formaldeide al 4% e fotografate a lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm (GFP) e 560 nm. Il software ImageJ è stato utilizzato per elaborare e analizzare le immagini. In tutto, sono state valutate 20-30 cellule da ciascuna immagine per ciascun campione. Le cellule sono state scelte a caso per avere un'idea veritiera su quello che si è fatto.

La quantificazione della colocalizzazione dei mitocondri e degli autofagosomi fornisce un'indicazione del grado di sequestro e potrebbe fungere da marker per la mitofagia. Anche il numero di mitocondri e punti colocalizzati GFP-LC3 aumenterebbe in presenza di inibitori lisosomiali come cloroquina.

Trasfezione TFEB(TEST)

L'esame della funzione di TFEB richiede che la proteina sia espressa nel giusto contesto cellulare e spesso è necessario modificare geneticamente. I geni clonati sono introdotti direttamente nelle cellule eucariotiche tramite un processo chiamato trasfezione. Nella trasfezione transiente il vettore utilizzato si replica autonomamente. Le cellule animali tenute in coltura sono state trattate in modo da favorire l'incorporazione del vettore ricombinante. Si impiega un vettore navetta. I vettori plasmidici contengono un'origine di replicazione virale, un promotore forte riconosciuto dalla RNA polimerasi II e, adiacente a questo, il cDNA che codifica la proteina che si vuole esprimere. Dopo aver raggiunto la cellula di mammifero il vettore comincia a replicare efficientemente grazie all'origine di replicazione virale e a generare numerosi plasmidi dai quali sarà espressa la proteina. Nella trasfezione transiente durante le varie divisioni cellulari questi plasmidi non saranno in grado di segregare fedelmente nelle cellule figlie e in breve tempo una frazione di cellule in coltura ne sarà priva.

Le cellule HEK293 (cellule renali embrionali umane) di confezionamento sono state coltivate in piastre in DMEM ad alto contenuto di glucosio (Gibco) integrato con FBS al 10%, L-glutammina, streptomina e penicillina e coltivate per 24 ore. Le cellule HEK293 sono state coltivate in coprioggetti e trasfettate utilizzando il reagente di trasfezione Fugene (Promega) con il plasmide I lenti virus (LV) sono tipicamente prodotti utilizzando linee cellulari HEK293 aderenti mediante trasfezione transitoria multiplasmide in mezzi contenenti siero. Si usa FBS al 10%, 1ml. Come prima cosa si toglie il terreno delle cellule, si fa risciacquo con DMEM, che toglie tutto il terreno precedente, perchè il terreno ha avuto antibiotico. Così si toglie il mezzo di pretrasfezione. Il nuovo terreno si prepara come 1ml di FBS e 9ml di terreno, privo di antibiotici. Le cellule sono state lasciate in incubatore a 37°C. Successivamente si aggiunge la cloroquina, che è una base debole e inibitore lisosomiale, in concentrazione di 5mM e va aggiunta la miscela di cloroquina e H₂O in ogni pozzetto al volume di 3,75µl. Il prossimo passo è stato di preparare il mix di DMEM, DNA e il reagente necessario per la trasfezione-FUGENE. Questa miscela lipofila è stata utilizzata con lo scopo di favorire la trasfezione con il plasmide TFEB-MYC e l'incorporazione del vettore nelle cellule HEK293, attraverso il passaggio della membrana plasmatica delle cellule e favorire l'aumento della permeabilità al DNA e così indurre la sovraespressione di TFEB. Le cellule di controllo non sono state trasfettate con TFEB, bensì con la sequenza amminoacidica MYC.

I lentivirus sono stati prodotti dalla trasfezione mediata da fosfato di calcio di cellule HEK293T con plasmidi vettoriali e plasmidi di confezionamento come psPAX2.

Digestione enzimatica del plasmide TFEB

Come prima cosa si fa una restrizione del plasmide in modo tale che il plasmide da piccolo e tondo diventa aperto e lineare. Gli enzimi di restrizione sono sempre endonucleasi.

Si fa la diluizione del plasmide a 1:10. Per fare 20 μ l totali si parte con 2 μ l di plasmide e 18 μ l di dH₂O. Quando è diluito si risospende. Per arrivare ai 50 μ l totali si aggiunge dH₂O. Si aggiunge il DNA diluito. Poi si mette il buffer, 5 μ l che serve per l'enzima di restrizione di tagliare il DNA plasmidico. Per l'ultima cosa va aggiunto l'enzima, 1 μ l. Si risospende brevemente con il puntale. Tutto si mette in termoshaker BioSAN a 37°C per 1 ora.

E' stata fatta anche digestione enzimatica per il TFEB, ma con più enzimi di restrizione. Sono stati usati gli enzimi SpeI, NotI e NheI in quantità di 1 μ l. Buffer per la digestione, 5 μ l, DNA plasmidico, dH₂O. Il procedimento per preparare la reazione di digestione è sempre che si parte dalla quantità maggiore (dH₂O) fino alla quantità minore che sono gli enzimi. Dopo che il mix è stato preparato, è stato mischiato, poi messo in thermoshaker per 3 ore a 37°C.

Sequenziamento del plasmide TFEB-MYC

600 ng di plasmide insieme con primers Reverse and Forward, ciascuno 0,6 μL . Il plasmide è circolare e i primers si attaccano alle sequenze specifiche, volute in diverse direzioni. I primers di sequenziamento vanno spinnati brevemente e vanno risospesi in dH_2O , senza vortexare ulteriormente. Vanno agitati sul fondo. La concentrazione dei primers è 10 μM . Il volume finale è 20 μL di plasmide, preparata da 2 μL di plasmide + 18 μL di H_2O . Successivamente sono stati messi in termociclatore 65°C finché si essicano e rimangono scoperti, per essiccarsi completamente.

La mutagenesi sito-diretta è stata eseguita e la correttezza è stata verificata tramite sequenziamento.

Tutti i costrutti sono stati confermati dal sequenziamento.

Gel di elettroforesi

Il gel di corsa per il TFEB è meno concentrato rispetto a quello standard da 1%. È stato preparato un gel a 0,7%, pesando 0,49 grammi di agarosio in polvere e poi sciolti in 70 ml di soluzione di TBE 1X. Questa soluzione successivamente è stata scaldata fino all'ebollizione in microonde in modo tale che diventa limpida. Poi è stata raffreddata ed è stato aggiunto l'agente intercalante in concentrazione 10 000X. Questa soluzione ancora tiepida va versata nella vaschetta per la corsa del gel e si lascia in riposo per gelificare completamente. Prima che la soluzione va versata sono stati messi pettini di plastica in modo tale che al contatto con la soluzione che comincia a gelificare si formano pozzetti, dove poi sono iniettate le reazioni in soluzione. Serve anche un marcatore di peso per poter definire la banda. I campioni sono mischiati con il cosiddetto loading dye, che è un composto contenente glicerolo e serve per concentrare il campione nel pozzetto del gel formato. I pettini vanno tolti delicatamente appena il gel è solidificato. Dopo che i campioni sono stati caricati nei pozzetti del gel si chiude la vaschetta e si applica la corrente.

La migrazione elettroforetica su gel si segue osservando lo spostamento di una sostanza colorata (il tracciante) lungo il gel. Il tracciante è un composto elettricamente carico a basso peso molecolare, che si introduce nel pozzetto, all'inizio dell'analisi, insieme con il campione.

L'etidio bromuro è un composto a struttura planare, in grado di intercalarsi tra le coppie di basi del DNA. L'intercalazione accresce la distanza tra le coppie di basi adiacenti e distorce la doppia elica , aumentando la sua lunghezza.

Alla fine della corsa sul gel si fa a vedere la banda alla fluorescenza tramite il metodo di UV.

Dopo la corsa sul gel, il gel è stato osservato in una camera speciale per la fluorescenza. Per ottenere la banda del TFEB-MYC, il gel è stata tagliato con la bisturi in pezzetti e il pezzo di interesse è stato messo in una provetta di peso 1102 mg e il peso del gel è 1380 mg. Il peso del pezzo del gel di interesse è stato determinato sulla base della differenza tra i due pesi, che è 278 mg.

L'elettroforesi su gel è stata eseguita a 150 V per circa 1 ora.

E' stato usato il buffer di solvente 4x peso della banda del gel, cioè $4 \times 278 = 1112 \mu\text{L}$ e tutto è stato messo in Thermo Shaker e dopo 15 minuti è stato dissolto completamente a 50°C . Sono stati caricati $800 \mu\text{L}$ della soluzione del buffer dissolvente e il gel sciolto nella colonna con il tubo. Seguito da una centrifuga per 1 minuto e scarico del flusso dalla colonna.. L'operazione è stata ripetuta ancora una volta. Il DNA rimane attaccato alla colonna di silice che è nel tubo. Le colonine contengono silice impaccata . La soluzione contenente il DNA è fatta passare per centrifugazione attraverso la resina. In questo modo è ottenuto il legame del DNA che in queste condizioni è semidenaturato. Il distacco dalla resina è dato dal passaggio della soluzione di Wash buffer $200 \mu\text{L}$ che è a basse concentrazioni di sali e priva di etanolo. Con questo buffer è stata lavata la colonna e successivamente è stata applicata altra centrifuga per 1 minuto. Dopo la centrifuga la colonna è stata spostata in un'altra Eppendorf pulita e lavata con $10 \mu\text{L}$ di H_2O nucleasi free e lasciata in riposo per 1 minuto. Nuova centrifuga per 1 minuto. Dopo la purificazione del plasmide TFEB è stata fatta la quantificazione tramite la misurazione della concentrazione del TFEB su nanodrop, dopo di che è stato usato come template per la PCR.

I primers designati per il TFEB sono arrivati liofilizzati sono stati risospesi con poca quantità di dH₂O. Il volume di dH₂O necessario per la risospensione dei primers è stato calcolato sulla base del numero di nmoli di ciascun primer moltiplicato per 10.

Sono stati utilizzati i seguenti primer per TFEB-MYC, con la sequenza:

27,4 nmoli 5'TGC GGC CGC GGA TCC TAG AAA GCT TGA CAG CAC ATC GCC3'

16,8 nmoli 5'TGC GGC CGC GGA TCC CAA TGA TGA TGA TGA TGG TCG A3'

24,6 nmoli 5' CCT CGA GGT TTA AAC GCC ACC ATG GCG TCA CGC ATA3'

19,4 nmoli 5' ACT AGC CTC GAG GTT TAA ACG CCA CCA TGG CGT CAC GCA TA3'

Si è voluto amplificare TFEB-MYC con primer 6 fwinfusionires-tfeb, nmoli 19,4. Le sequenze di targeting che prendono di mira l'esone 3 di TFEB sono le seguenti: 5'-3' ACT AGC CTC GAG GTT TAA ACG CCA CCA TGG CGT CAC GCA TA

È stato usato il programma standard della Promega x35 cicli. È stato preparato il mix per la PCRx5. Con i reagenti H₂O nucleasi free, 5xGo Taq buffer, dNTP, Primer Reverse and Forward, DMSO, enzima Taq e il campione diluito 1:100 del TFEB-MYC per ogni tubino. Dopo che il mix è stato preparato si è applicata una breve spinnata in modo tale da eliminare eventuali bolle e goccioline sparse. Per l'annealing le temperature selezionate sono 59°C, 60°C e 61°C.

Dalla sequenza che è stata amplificata al PCR si è voluto vedere la banda del TFEB che è la sua sequenza. Per poter osservare la giusta banda della sequenza amplificata è stato preparato un gel di agarosio. La banda del promotore TFEB-MYC contiene 1511 paia di basi.

Il promotore TFEB contenente 1511 bp. La regione del promotore canonico è stata subclonata in un vettore contenente un reporter luciferasi di lucciola.

La sequenza di targeting di TFEB è stata clonata nel plasmide.

Trasformazione

Nelle cellule batteriche è stato trasferito il DNA esogeno, cioè il plasmide TFEB-MYC. E' stata fatta incubazione per 30 minuti in ghiaccio, successivamente per 20-30 secondi a 42°C, si applica uno shock termico. Poi di nuovo in ghiaccio per 2 minuti. Sono stati aggiunti 950 µL di terreno di Bertani-Luria, senza antibiotico. Dopo di che a 37°C per 1 ora a 225rpm. Successivamente le piastre si risospendono in 75 µL ciascuna e alla fine sono state incubate a 37°C per tutta la notte. I batteri resistenti all'ampicillina sono stati trasformati e le colonie batteriche sono state quindi amplificate per isolare il DNA plasmidico utilizzando un mini prep Isolation Kit (qiagen).

Tutti i costrutti plasmidici sono stati generati utilizzando tecniche di biologia molecolare standard. Le sequenze del promotore e il sito di legame TFEB sono stati identificati. Vettore ed inserto sono stati legati tramite un mix che contiene l'enzima che gli lega, ligasi. Il vettore è stato linearizzato tramite digestione enzimatica con le endonucleasi di restrizione PmeI e BamHI. L'inserto è il DNA del plasmide PWPX2.

I batteri sono stati trasformati, dopo che sono stati lasciati per 1 ora su gel di agar solido. Le cellule batteriche trasformate sono state ottenute dal picking. Dalle piastre si prendono le colonie fatte crescere e poi trasferite nelle piastre piccole. Il frammento Klenow di SpeI, NotI e NheI contenente TFEB-MYC da pTFEB-MYC è stato inserito in PWPX2-Ires puro trattato con PmeI e BamHI. La coltura batterica notturna (*Escherichia coli*) è stata diluita 1:100 e incubata con agitazione a 37°C in terreno di Bertani-Luria con ampicillina (100 microgrammi al millilitro).

Miniprep per TFEB-MYC

L'obiettivo è di purificare il DNA plasmidico.

La separazione tra DNA genomico e DNA plasmidico avviene per due motivi, il più importante riguarda la grandezza. Il DNA genomico viene intrappolato dalla formazione delle membrane da cui non esce tanto facilmente, l'altra ragione è che nei batteri il DNA è comunque legato a proteine ed alla parete batterica, il che complica la sua mobilità e solubilità. L'estrazione del DNA plasmidico è stata effettuata a partire da colture fresche, in quanto l'utilizzo di colture vecchie potrebbe influenzare negativamente la corretta purificazione del DNA a causa dell'accumulo di metaboliti secondari. Sono stati usati 3ml di Escherichia coli in LB medium of an overnight culture. Questi 3 ml sono stati divisi in due provette da 1,5 ml. La prima coltura è stata per prova per codifica dell'inserito nel lentivirus e l'altra per produrre le proteine virali. Le cellule HEK sono state trasfettate con il plasmide per produrre virus lentivirali. L'obiettivo è stato quello di ottenere il virus e di trasfettare i fibroblasti.

Protocollo

1. Centrifuga a 4000g per 10 minuti
2. Eliminazione del surnatante
3. Risospensione del pellet in 500µl di dH₂O e la sospensione va trasferita in una provetta Eppendorf di 1,5 ml.
4. Centrifugazione per 2 minuti alla massima velocità in una microcentrifuga.
5. Eliminazione del surnatante.
6. Aggiunta di 0,4 ml di buffer P1, di resospensione (50 mM Tris-HCl, pH8,0, 0,10 mM EDTA, 100ng/ml RNAsi free 85 µL). La RNA si va aggiunta al pellet finché è ancora omogeneo. EDTA sottrae ioni Mg²⁺, così inibendo la nucleasi che potrebbe degradare il DNA. La RNAsi invece alla rottura delle cellule frammenta l'RNA. Il Tris pH=8 mantiene il DNA in soluzione.
7. Risospensione delle cellule
8. Aggiunta di colonine di silice nelle provette e equilibratura con l'aggiunta del buffer equilibrante Invitrogen.
- 8 Nuova centrifugazione, i batteri sono stati scartati dalle provette e rimane sul fondo il pellet. E' stato aggiunto il buffer R3 di 400µL che è stato tenuto in ghiaccio. Il pellet è stato sospeso bene finché si è disgregato completamente. Le due provette sono state unite.
9. Aggiunta di 400 µL di buffer L7 per la lisi alcalina (200 mM NaOH, 1% SDS (p/V)) e la provetta è stata capovolta delicatamente per 5 volte e poi lasciata in riposo per altre 5 minuti. Questo passaggio evita il vortex per evitare di frammentare il DNA cromosomico e si provoca la denaturazione di DNA e proteine e la solubilizzazione delle membrane. I pellet sono stati scritti come PWPX1 e 2; PSPAX 1 e 2; e PMD1 e 2.

10. Passati i 5 minuti è stato aggiunto il buffer di neutralizzazione N3 (contenente potassio acetato, acido acetico, pH= 5.). Questo passaggio consente la neutralizzazione del pH, la rinaturazione selettiva del solo DNA plasmidico, mentre quello cromosomiale si riassocia male, ingarbugliandosi. Di nuovo la provetta va capovolta per 5 volte delicatamente.
11. Centrifuga a 12000g per 10 minuti a temperatura ambiente. Questo passaggio è stato fatto per eliminare membrane e DNA cromosomico. Rimane soltanto il DNA plasmidico in soluzione.
12. Dopo la centrifuga è stato aspirato il surnatante e trasferito in una nuova provetta Eppendorf. Il sedimento contenente pareti, complessi del DNA cromosomico e proteine denaturate è stato scartato.
13. Trasferimento del contenuto della provetta su una microcolonna.
- 14 Centrifugazione per 1 minuto in microcentrifuga.
15. Eliminazione del liquido che è stato filtrato attraverso la microcolonna.
16. Aggiunta alla microcolonna del tampone di lavaggio 2,5 ml per ogni falcon. E' stato fatto un doppio lavaggio.
17. Centrifuga per 1 minuto e trasferimento della microcolonna su una provetta Eppendorf.
18. Aggiunta di 900 μ L di buffer di eluizione (10 mM Tris-HCl, pH=8,5) per eluire il DNA plasmidico sequestrato nelle colonnine. Le colonnine sono state spostate dai falcon su provette sterili. Il DNA plasmidico è stato raccolto per l'effetto della gravità.
19. Precipitazione del DNA plasmidico con l'aggiunta di 0,9 volumi di isopropanolo con delicata agitazione. Questo passaggio è stato fatto per sottrarre molecole di H₂O al DNA e facendolo così precipitare.
20. Centrifuga a 12000g per 30 minuti a 4°C e scarto del surnatante.
21. Aggiunta di 1 ml del 70% di etanolo al pellet rimasto dopo la centrifuga. Questo passaggio è stato fatto per eliminare i sali.
22. Centrifuga a 12000g per 5 minuti a 4°C e scarto del surnatante.
23. Le provette sono state lasciate ad essicarsi all'aria per 10 minuti.
24. Risospensione del pellet in H₂O nucleasi free.
25. Quantificazione del DNA plasmidico al Nanodrop Promega. La prova in bianco va fatta con dH₂O.

Analisi statistica

I dati sono stati tracciati come $\text{media} \pm \text{DS}$ e la significativa statistica è stata determinata utilizzando il test t di studente a due code, dove *** $p < 0,05$** , **** $p < 0,01$**

L'analisi statistica è stata condotta con il t test. I dati quantitativi sono presentati come $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti indipendentemente almeno tre volte.

Tutti i dati di immagini presentati sono rappresentati di almeno tre esperimenti indipendenti. I dati numerici sono presentati come medie $\pm \text{SD}$ da 2-3 esperimenti indipendenti e analizzati utilizzando il test di Student.

Bibliografia

Aerts L, Craessaerts K, De Strooper B, Morais VA. PINK1 kinase catalytic activity is regulated by phosphorylation on serines 228 and 402. *J Biol Chem*. 2015;290(5):2798-2811. doi:10.1074/jbc.M114.620906

Allossary AM, Tawfik EA, Alomary MN, et al. Recent advances in mitochondrial diseases: From molecular insights to therapeutic perspectives. *Saudi Pharm J*. 2022;30(8):1065-1078. doi:10.1016/j.jsps.2022.05.011

Almannai M, El-Hattab AW, Ali M, Soler-Alfonso C, Scaglia F. Clinical trials in mitochondrial disorders, an update. *Mol Genet Metab*. 2020;131(1-2):1-13. doi:10.1016/j.ymgme.2020.10.002

Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, Turnbull DM, Taylor RW. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol*. 2017;241(2):236-250. doi:10.1002/path.4809

Amore G, Romagnoli M, Carbonelli M, Barboni P, Carelli V, La Morgia C. Therapeutic Options in Hereditary Optic Neuropathies. *Drugs*. 2021;81(1):57-86. doi:10.1007/s40265-020-01428-3

Anding AL, Baehrecke EH. Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev Cell*. 2017;41(1):10-22. doi:10.1016/j.devcel.2017.02.016

Annunziata, I., van de Vlekkert, D., Wolf, E., Finkelstein, D., Neale, G., Machado, E., Mosca, R., Campos, Y., Tillman, H., Roussel, M. F., Andrew Weesner, J., Ellen Fremuth, L., Qiu, X., Han, M. J., Grosveld, G. C., & d'Azzo, A. (2019). MYC competes with MiT/TFE in regulating lysosomal biogenesis and autophagy through an epigenetic rheostat. *Nature communications*, 10(1), 3623. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11568-0>

Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ*. 2013;20(1):31-42. doi:10.1038/cdd.2012.81

Bajaj L, Lotfi P, Pal R, Ronza AD, Sharma J, Sardiello M. Lysosome biogenesis in health and disease. *J Neurochem*. 2019;148(5):573-589. doi:10.1111/jnc.14564

Baglivo M, Nasca A, Lamantea E, et al. Evaluation of Mitochondrial Dysfunction and Idebenone Responsiveness in Fibroblasts from Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) Subjects. *Int J Mol Sci*. 2023;24(16):12580. Published 2023 Aug 8. doi:10.3390/ijms241612580

Belousov DM, Mikhaylenko EV, Somasundaram SG, Kirkland CE, Aliev G. The Dawn of Mitophagy: What Do We Know by Now?. *Curr Neuropharmacol*. 2021;19(2):170-192. doi:10.2174/1570159X18666200522202319

Bezawork-Geleta A, Rohlena J, Dong L, Pacak K, Neuzil J. Mitochondrial Complex II: At the Crossroads. *Trends Biochem Sci*. 2017;42(4):312-325. doi:10.1016/j.tibs.2017.01.003

Brady, O. A., Martina, J. A., & Puertollano, R. (2018). Emerging roles for TFEB in the immune response and inflammation. *Autophagy*, 14(2), 181–189. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1313943>

Cheng L, Chen Y, Guo D, et al. mTOR-dependent TFEB activation and TFEB overexpression enhance autophagy-lysosome pathway and ameliorate Alzheimer's disease-like pathology in diabetic encephalopathy. *Cell Commun Signal*. 2023;21(1):91. Published 2023 May 4. doi:10.1186/s12964-023-01097-1

Chen M, Dai Y, Liu S, Fan Y, Ding Z, Li D. TFEB Biology and Agonists at a Glance. *Cells*. 2021 Feb 5;10(2):333. doi:10.3390/cells10020333. PMID: 33562649; PMCID: PMC7914707

Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull*. 2013;106(1):135-159. doi:10.1093/bmb/ldt017

Civiletto G, Dogan SA, Cerutti R, et al. Rapamycin rescues mitochondrial myopathy via coordinated activation of autophagy and lysosomal biogenesis. *EMBO Mol Med*. 2018;10(11):e8799. doi:10.15252/emmm.201708799

Collodet C, Foretz M, Deak M, et al. AMPK promotes induction of the tumor suppressor FLCN through activation of TFEB independently of mTOR. *FASEB J*. 2019;33(11):12374-12391. doi:10.1096/fj.201900841R

Cortes, C. J., & La Spada, A. R. (2019). TFEB dysregulation as a driver of autophagy dysfunction in neurodegenerative disease: Molecular mechanisms, cellular processes, and emerging therapeutic opportunities. *Neurobiology of disease*, 122, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.05.012>

Dang, T. T., & Back, S. H. (2021). Translation Inhibitors Activate Autophagy Master Regulators TFEB and TFE3. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 12083. <https://doi.org/10.3390/ijms222112083>

Del Monte, F., Angelini, F., Villar, A. M., & Gabbarini, F. (2021). The arrhythmic risk in Kearns-Sayre syndrome: still many questions unanswered. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*, 23(6), 980–981. <https://doi.org/10.1093/europace/euab104>

Demine S, Renard P, Arnould T. Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. *Cells*. 2019;8(8):795. Published 2019 Jul 30. doi:10.3390/cells8080795

Di Malta, C., & Ballabio, A. (2017). TFEB-mTORC1 feedback loop in metabolism and cancer. *Cell stress*, 1(1), 7–10. <https://doi.org/10.15698/cst2017.10.103>

Ding, W. X., & Yin, X. M. (2012). Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological chemistry*, 393(7), 547–564. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0119>

Diogo, C. V., Yambire, K. F., Fernández Mosquera, L., Branco F, T., & Raimundo, N. (2018). Mitochondrial adventures at the organelle society. *Biochemical and biophysical research communications*, 500(1), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.124>

Doblado, L., Lueck, C., Rey, C., Samhan-Arias, A. K., Prieto, I., Stacchiotti, A., & Monsalve, M. (2021). Mitophagy in Human Diseases. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 3903. <https://doi.org/10.3390/ijms22083903>

Do Minh, A., Star, A. T., Stupak, J., Fulton, K. M., Haqqani, A. S., Gélinas, J. F., Li, J., Twine, S. M., & Kamen, A. A. (2021). Characterization of Extracellular Vesicles Secreted in Lentiviral Producing HEK293SF Cell Cultures. *Viruses*, 13(5), 797. <https://doi.org/10.3390/v13050797>

Doronzo, G., Astanina, E., & Bussolino, F. (2021). The Oncogene Transcription Factor EB Regulates Vascular Functions. *Frontiers in physiology*, 12, 640061. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.640061>

El-Houjeiri, L., Possik, E., Vijayaraghavan, T., Paquette, M., Martina, J. A., Kazan, J. M., Ma, E. H., Jones, R., Blanchette, P., Puertollano, R., & Pause, A. (2019). The Transcription Factors TFEB and TFE3 Link the FLCN-AMPK Signaling Axis to Innate Immune Response and Pathogen Resistance. *Cell reports*, 26(13), 3613–3628.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.102>

Erlich, A. T., Brownlee, D. M., Beyfuss, K., & Hood, D. A. (2018). Exercise induces TFEB expression and activity in skeletal muscle in a PGC-1 α -dependent manner. *American journal of physiology. Cell physiology*, 314(1), C62–C72. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00162.2017>

Evans, T. D., Jeong, S. J., Zhang, X., Sergin, I., & Razani, B. (2018). TFEB and trehalose drive the macrophage autophagy-lysosome system to protect against atherosclerosis. *Autophagy*, 14(4), 724–726. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1434373>

Fang, S., Wan, X., Zou, X., Sun, S., Hao, X., Liang, C., Zhang, Z., Zhang, F., Sun, B., Li, H., & Yu, B. (2021). Arsenic trioxide induces macrophage autophagy and atheroprotection by regulating ROS-dependent TFEB nuclear translocation and AKT/mTOR pathway. *Cell death & disease*, 12(1), 88. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03357-1>

Fernández-Mosquera, L., Diogo, C. V., Yambire, K. F., Santos, G. L., Luna Sánchez, M., Bénit, P., Rustin, P., Lopez, L. C., Milosevic, I., & Raimundo, N. (2017). Acute and chronic mitochondrial respiratory chain deficiency differentially regulate lysosomal biogenesis. *Scientific reports*, 7, 45076. <https://doi.org/10.1038/srep45076>

Fernandez-Mosquera, L., Yambire, K. F., Couto, R., Pereyra, L., Pabis, K., Ponsford, A. H., Diogo, C. V., Stagi, M., Milosevic, I., & Raimundo, N. (2019). Mitochondrial respiratory chain deficiency inhibits lysosomal hydrolysis. *Autophagy*, *15*(9), 1572–1591. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1586256>

Ferron M, Settembre C, Shimazu J, et al. A RANKL-PKC β -TFEB signaling cascade is necessary for lysosomal biogenesis in osteoclasts. *Genes Dev.* 2013;*27*(8):955-969. doi:10.1101/gad.213827.113

Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res.* 2012;*111*(9):1198-1207. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.268946

Garza-Lombó C, Pappa A, Panayiotidis MI, Franco R. Redox homeostasis, oxidative stress and mitophagy. *Mitochondrion.* 2020;*51*:105-117. doi:10.1016/j.mito.2020.01.002

Gebrie A. Transcription factor EB as a key molecular factor in human health and its implication in diseases. *SAGE Open Med.* 2023;*11*:20503121231157209. Published 2023 Feb 28. doi:10.1177/20503121231157209

Gerards M, Sallevelt SC, Smeets HJ. Leigh syndrome: Resolving the clinical and genetic heterogeneity paves the way for treatment options. *Mol Genet Metab.* 2016;*117*(3):300-312. doi:10.1016/j.ymgme.2015.12.004

Hamacher-Brady A, Brady NR. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci.* 2016;*73*(4):775-795. doi:10.1007/s00018-015-2087-8

Hasegawa, J., Tokuda, E., Yao, Y., Sasaki, T., Inoki, K., & Weisman, L. S. (2022). PP2A-dependent TFEB activation is blocked by PIKfyve-induced mTORC1 activity. *Molecular biology of the cell*, *33*(3), ar26. <https://doi.org/10.1091/mbc.E21-06-0309>

Heighton JN, Brady LI, Sadikovic B, Bulman DE, Tarnopolsky MA. Genotypes of chronic progressive external ophthalmoplegia in a large adult-onset cohort. *Mitochondrion.* 2019;*49*:227-231. doi:10.1016/j.mito.2019.09.002

Herst PM, Rowe MR, Carson GM, Berridge MV. Functional Mitochondria in Health and Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;*8*:296. Published 2017 Nov 3. doi:10.3389/fendo.2017.00296

Hirst J. Open questions: respiratory chain supercomplexes-why are they there and what do they do?. *BMC Biol.* 2018;*16*(1):111. Published 2018 Nov 1. doi:10.1186/s12915-018-0577-5

Hsu CL, Lee EX, Gordon KL, et al. MAP4K3 mediates amino acid-dependent regulation of autophagy via phosphorylation of TFEB. *Nat Commun.* 2018;*9*(1):942. Published 2018 Mar 5. doi:10.1038/s41467-018-03340-7

Hu SY, Zhuang QQ, Qiu Y, Zhu XF, Yan QF. Cell models and drug discovery for mitochondrial diseases. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2019;*20*(5):449-456. doi:10.1631/jzus.B1900196

Ivankovic D, Chau KY, Schapira AH, Gegg ME. Mitochondrial and lysosomal biogenesis are activated following PINK1/parkin-mediated mitophagy. *J Neurochem.* 2016;*136*(2):388-402. doi:10.1111/jnc.13412

Jiao F, Zhou B, Meng L. The regulatory mechanism and therapeutic potential of transcription factor EB in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther.* 2023;*29*(1):37-59. doi:10.1111/cns.13985

Kampjut D, Sazanov LA. Structure of respiratory complex I - An emerging blueprint for the mechanism. *Curr Opin Struct Biol.* 2022;*74*:102350. doi:10.1016/j.sbi.2022.102350

Katayama H, Hama H, Nagasawa K, et al. Visualizing and Modulating Mitophagy for Therapeutic Studies of Neurodegeneration. *Cell.* 2020;*181*(5):1176-1187.e16. doi:10.1016/j.cell.2020.04.025

Killackey SA, Philpott DJ, Girardin SE. Mitophagy pathways in health and disease. *J Cell Biol.* 2020;*219*(11):e202004029. doi:10.1083/jcb.202004029

Kim M, Lu L, Dvornikov AV, et al. TFEB Overexpression, Not mTOR Inhibition, Ameliorates RagCs75Y Cardiomyopathy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5494. Published 2021 May 23. doi:10.3390/ijms22115494

Kim, S., Choi, K. J., Cho, S. J., Yun, S. M., Jeon, J. P., Koh, Y. H., Song, J., Johnson, G. V., & Jo, C. (2016). Fisetin stimulates autophagic degradation of phosphorylated tau via the activation of TFEB and Nrf2 transcription factors. *Scientific reports*, 6, 24933. <https://doi.org/10.1038/srep24933>

Kimura, T., Hayama, Y., Okuzaki, D., Nada, S., & Okada, M. (2022). The Ragulator complex serves as a substrate-specific mTORC1 scaffold in regulating the nuclear translocation of transcription factor EB. *The Journal of biological chemistry*, 298(3), 101744. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101744>

Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., Agostinis, P., ... Tong, C. K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)¹. *Autophagy*, 17(1), 1–382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>

Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* 2015;13:89. Published 2015 Oct 29. doi:10.1186/s12915-015-0201-x

Lawrence RE, Cho KF, Rappold R, et al. A nutrient-induced affinity switch controls mTORC1 activation by its Rag GTPase-Ragulator lysosomal scaffold. *Nat Cell Biol.* 2018;20(9):1052-1063. doi:10.1038/s41556-018-0148-6

Lemasters J. J. (2014). Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox biology*, 2, 749–754. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.06.004>

Li, M., Wang, Z., Wang, P., Li, H., & Yang, L. (2021). TFEB: A Emerging Regulator in Lipid Homeostasis for Atherosclerosis. *Frontiers in physiology*, 12, 639920. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.639920>

Liu W, Li CC, Lu X, Bo LY, Jin FG. Overexpression of transcription factor EB regulates mitochondrial autophagy to protect lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Chin Med J (Engl)*. 2019;132(11):1298-1304. doi:10.1097/CM9.0000000000000243

Lu Y, Li Z, Zhang S, Zhang T, Liu Y, Zhang L. Cellular mitophagy: Mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation. *Theranostics*. 2023;13(2):736-766. Published 2023 Jan 1. doi:10.7150/thno.79876

Ma X, Ding WX. A fluorescence imaging based-assay to monitor mitophagy in cultured hepatocytes and mouse liver. *Liver Res.* 2021;5(1):16-20. doi:10.1016/j.livres.2020.12.002

Manceur, A. P., Kim, H., Misic, V., Andreev, N., Dorion-Thibaudeau, J., Lanthier, S., Bernier, A., Tremblay, S., Gélinas, A. M., Broussau, S., Gilbert, R., & Ansorge, S. (2017). Scalable Lentiviral Vector Production Using Stable HEK293SF Producer Cell Lines. *Human gene therapy methods*, 28(6), 330–339. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2017.086>

Mansueto, G., Armani, A., Viscomi, C., D'Orsi, L., De Cegli, R., Polishchuk, E. V., Lamperti, C., Di Meo, I., Romanello, V., Marchet, S., Saha, P. K., Zong, H., Blaauw, B., Solagna, F., Tezze, C., Grumati, P., Bonaldo, P., Pessin, J. E., Zeviani, M., Sandri, M., ... Ballabio, A. (2017). Transcription Factor EB Controls Metabolic Flexibility during Exercise. *Cell metabolism*, 25(1), 182–196. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.003>

Martina, J. A., & Puertollano, R. (2017). TFEB and TFE3: The art of multi-tasking under stress conditions. *Transcription*, 8(1), 48–54. <https://doi.org/10.1080/21541264.2016.1264353>

Martina, J. A., & Puertollano, R. (2018). Protein phosphatase 2A stimulates activation of TFEB and TFE3 transcription factors in response to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 293(32), 12525–12534. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003471>

Martini-Stoica, H., Xu, Y., Ballabio, A., & Zheng, H. (2016). The Autophagy-Lysosomal Pathway in Neurodegeneration: A TFEB Perspective. *Trends in neurosciences*, 39(4), 221–234. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.02.002>

- Mazat JP, Devin A, Ransac S. Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(3):455-465. doi:10.1007/s00018-019-03381-1
- Medina DL, Di Paola S, Peluso I, Armani A, De Stefani D, Venditti R, Montefusco S, Scotto-Rosato A, Prezioso C, Forrester A, Settembre C, Wang W, Gao Q, Xu H, Sandri M, Rizzuto R, De Matteis MA, Ballabio A. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol*. 2015 Mar;17(3):288-99. doi: 10.1038/ncb3114. PMID: 25720963; PMCID: PMC4801004.
- Miller, A. J., Levy, C., Davis, I. J., Razin, E., & Fisher, D. E. (2005). Sumoylation of MITF and its related family members TFE3 and TFEB. *The Journal of biological chemistry*, 280(1), 146–155. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411757200>
- Mustafa MF, Fakurazi S, Abdullah MA, Maniam S. Pathogenic Mitochondria DNA Mutations: Current Detection Tools and Interventions. *Genes (Basel)*. 2020;11(2):192. Published 2020 Feb 12. doi:10.3390/genes11020192
- Napolitano G, Esposito A, Choi H, et al. mTOR-dependent phosphorylation controls TFEB nuclear export. *Nat Commun*. 2018;9(1):3312. Published 2018 Aug 17. doi:10.1038/s41467-018-05862-6
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*. 2008;183(5):795-803. doi:10.1083/jcb.200809125
- Nezich CL, Wang C, Fogel AI, Youle RJ. MiT/TFE transcription factors are activated during mitophagy downstream of Parkin and Atg5. *J Cell Biol*. 2015;210(3):435-450. doi:10.1083/jcb.201501002
- Nguyen, T. N., Padman, B. S., & Lazarou, M. (2016). Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends in cell biology*, 26(10), 733–744. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.008>
- Nnah IC, Wang B, Saqcena C, et al. TFEB-driven endocytosis coordinates MTORC1 signaling and autophagy. *Autophagy*. 2019;15(1):151-164. doi:10.1080/15548627.2018.1511504
- Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012;148(6):1145-1159. doi:10.1016/j.cell.2012.02.035
- Ogura M, Shima T, Yoshimori T, Nakamura S. Protocols to monitor TFEB activation following lysosomal damage in cultured cells using microscopy and immunoblotting. *STAR Protoc*. 2022;3(1):101018. Published 2022 Jan 7. doi:10.1016/j.xpro.2021.101018
- Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., & Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO journal*, 40(3), e104705. <https://doi.org/10.15252/emboj.2020104705>
- Pacheu-Grau, D., Rucktäschel, R., & Deckers, M. (2018). Mitochondrial dysfunction and its role in tissue-specific cellular stress. *Cell stress*, 2(8), 184–199. <https://doi.org/10.15698/cst2018.07.147>
- Padman, B. S., Nguyen, T. N., Uoselis, L., Skulsuppaisarn, M., Nguyen, L. K., & Lazarou, M. (2019). LC3/GABARAPs drive ubiquitin-independent recruitment of Optineurin and NDP52 to amplify mitophagy. *Nature communications*, 10(1), 408. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08335-6>
- Palikaras, K., Lionaki, E., & Tavernarakis, N. (2018). Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nature cell biology*, 20(9), 1013–1022. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0176-2>
- Palmieri, M., Pal, R., & Sardiello, M. (2017). AKT modulates the autophagy-lysosome pathway via TFEB. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 16(13), 1237–1238. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1337968>

- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., & Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human molecular genetics*, *20*(19), 3852–3866. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr306>
- Paquette, M., El-Houjeiri, L., C Zirden, L., Puustinen, P., Blanchette, P., Jeong, H., Dejgaard, K., Siegel, P. M., & Pause, A. (2021). AMPK-dependent phosphorylation is required for transcriptional activation of TFEB and TFE3. *Autophagy*, *17*(12), 3957–3975. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1898748>
- Park, J. Y., Sohn, H. Y., Koh, Y. H., & Jo, C. (2021). A splicing variant of TFEB negatively regulates the TFEB-autophagy pathway. *Scientific reports*, *11*(1), 21119. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00613-y>
- Park, S., Choi, S. G., Yoo, S. M., Nah, J., Jeong, E., Kim, H., & Jung, Y. K. (2015). Pyruvate stimulates mitophagy via PINK1 stabilization. *Cellular signalling*, *27*(9), 1824–1830. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.05.020>
- Parczyk, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, *20*(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Pastore, N., Brady, O. A., Diab, H. I., Martina, J. A., Sun, L., Huynh, T., Lim, J. A., Zare, H., Raben, N., Ballabio, A., & Puertollano, R. (2016). TFEB and TFE3 cooperate in the regulation of the innate immune response in activated macrophages. *Autophagy*, *12*(8), 1240–1258. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1179405>
- Perry, C., & Rayat, A. (2021). Lentiviral Vector Bioprocessing. *Viruses*, *13*(2), 268. <https://doi.org/10.3390/v13020268>
- Picca, A., Calvani, R., Coelho-Junior, H. J., & Marzetti, E. (2021). Cell Death and Inflammation: The Role of Mitochondria in Health and Disease. *Cells*, *10*(3), 537. <https://doi.org/10.3390/cells10030537>
- Pickles, S., Vigié, P., & Youle, R. J. (2018). Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *Current biology : CB*, *28*(4), R170–R185. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.004>
- Protasoni, M., & Zeviani, M. (2021). Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International journal of molecular sciences*, *22*(2), 586. <https://doi.org/10.3390/ijms22020586>
- Puertollano, R., Ferguson, S. M., Brugarolas, J., & Ballabio, A. (2018). The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization. *The EMBO journal*, *37*(11), e98804. <https://doi.org/10.15252/embj.201798804>
- Raben, N., & Puertollano, R. (2016). TFEB and TFE3: Linking Lysosomes to Cellular Adaptation to Stress. *Annual review of cell and developmental biology*, *32*, 255–278. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125407>
- Rak M, Bénit P, Chrétien D, et al. Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(6):393-407. doi:10.1042/CS20150707
- Ramirez Reyes, J., Cuesta, R., & Pause, A. (2021). Folliculin: A Regulator of Transcription Through AMPK and mTOR Signaling Pathways. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 667311. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.667311>
- Rega, L. R., Polishchuk, E., Montefusco, S., Napolitano, G., Tozzi, G., Zhang, J., Bellomo, F., Taranta, A., Pastore, A., Polishchuk, R., Piemonte, F., Medina, D. L., Catz, S. D., Ballabio, A., & Emma, F. (2016). Activation of the transcription factor EB rescues lysosomal abnormalities in cystinotic kidney cells. *Kidney international*, *89*(4), 862–873. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2015.12.045>
- Relic, B., Deroyer, C., Malaise, O., Plener, Z., Gillet, P., de Seny, D., & Malaise, M. G. (2021). TFEB phosphorylation on Serine 211 is induced by autophagy in human synovial fibroblasts and by p62/SQSTM1 overexpression in HEK293 cells. *The Biochemical journal*, *478*(16), 3145–3155. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210174>
- Roczniak-Ferguson, A., Petit, C. S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T. C., & Ferguson, S. M. (2012). The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Science signaling*, *5*(228), ra42. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002790>

Rojansky, R., Cha, M. Y., & Chan, D. C. (2016). Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *eLife*, 5, e17896. <https://doi.org/10.7554/eLife.17896>

Rossmann, M. P., Dubois, S. M., Agarwal, S., & Zon, L. I. (2021). Mitochondrial function in development and disease. *Disease models & mechanisms*, 14(6), dmm048912. <https://doi.org/10.1242/dmm.048912>

Ryzhkova, A. I., Sazonova, M. A., Sinyov, V. V., Galitsyna, E. V., Chicheva, M. M., Melnichenko, A. A., Grechko, A. V., Postnov, A. Y., Orekhov, A. N., & Shkurat, T. P. (2018). Mitochondrial diseases caused by mtDNA mutations: a mini-review. *Therapeutics and clinical risk management*, 14, 1933–1942. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S154863>

Rusmini, P., Cortese, K., Crippa, V., Cristofani, R., Cicardi, M. E., Ferrari, V., Vezzoli, G., Tedesco, B., Meroni, M., Messi, E., Piccolella, M., Galbiati, M., Garrè, M., Morelli, E., Vaccari, T., & Poletti, A. (2019). Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration. *Autophagy*, 15(4), 631–651. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1535292>

Saada A. Mitochondria: mitochondrial OXPHOS (dys) function ex vivo--the use of primary fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;48:60-65. doi:10.1016/j.biocel.2013.12.010

Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D. L., Valenza, M., Gennarino, V. A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R. S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., & Ballabio, A. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5939), 473–477. <https://doi.org/10.1126/science.1174447>

Settembre, C., & Medina, D. L. (2015). TFEB and the CLEAR network. *Methods in cell biology*, 126, 45–62. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.11.011>

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., Facchinetti, V., Sabatini, D. M., & Ballabio, A. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO journal*, 31(5), 1095–1108. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.32>

Sharma, P., & Sampath, H. (2019). Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells*, 8(2), 100. <https://doi.org/10.3390/cells8020100>

Shefa, U., Jeong, N. Y., Song, I. O., Chung, H. J., Kim, D., Jung, J., & Huh, Y. (2019). Mitophagy links oxidative stress conditions and neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, 14(5), 749–756. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.249218>

Song, J. X., Liu, J., Jiang, Y., Wang, Z. Y., & Li, M. (2021). Transcription factor EB: an emerging drug target for neurodegenerative disorders. *Drug discovery today*, 26(1), 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.10>

Song, J. X., Sun, Y. R., Peluso, I., Zeng, Y., Yu, X., Lu, J. H., Xu, Z., Wang, M. Z., Liu, L. F., Huang, Y. Y., Chen, L. L., Durairajan, S. S., Zhang, H. J., Zhou, B., Zhang, H. Q., Lu, A., Ballabio, A., Medina, D. L., Guo, Z., & Li, M. (2016). A novel curcumin analog binds to and activates TFEB in vitro and in vivo independent of MTOR inhibition. *Autophagy*, 12(8), 1372–1389. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1179404>

Spampanato, C., Feeney, E., Li, L., Cardone, M., Lim, J. A., Annunziata, F., Zare, H., Polishchuk, R., Puertollano, R., Parenti, G., Ballabio, A., & Raben, N. (2013). Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO molecular medicine*, 5(5), 691–706. <https://doi.org/10.1002/emmm.2012021>

Spinelli, J. B., & Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature cell biology*, 20(7), 745–754. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>

Suomalainen, A., & Battersby, B. J. (2018). Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(2), 77–92. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.66>

Tan A, Prasad R, Lee C, Jho EH. Past, present, and future perspectives of transcription factor EB (TFEB): mechanisms of regulation and association with disease. *Cell Death Differ*. 2022;29(8):1433-1449. doi:10.1038/s41418-022-01028-6

Todkar, K., Ilamathi, H. S., & Germain, M. (2017). Mitochondria and Lysosomes: Discovering Bonds. *Frontiers in cell and developmental biology*, 5, 106. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00106>

Tol, M. J., van der Lienden, M., Gabriel, T. L., Hagen, J. J., Scheij, S., Veenendaal, T., Klumperman, J., Donker-Koopman, W. E., Verhoeven, A. J., Overkleeft, H., Aerts, J. M., Argmann, C. A., & van Eijk, M. (2018). HEPES activates a MiT/TFE-dependent lysosomal-autophagic gene network in cultured cells: A call for caution. *Autophagy*, 14(3), 437–449. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1419118>

Triolo, M., Oliveira, A. N., Kumari, R., & Hood, D. A. (2022). The influence of age, sex, and exercise on autophagy, mitophagy, and lysosome biogenesis in skeletal muscle. *Skeletal muscle*, 12(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13395-022-00296-7>

Vega-Rubin-de-Celis S, Peña-Llopis S, Konda M, Brugarolas J. Multistep regulation of TFEB by MTORC1. *Autophagy*. 2017;13(3):464-472. doi:10.1080/15548627.2016.1271514

Vercellino I, Sazanov LA. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(2):141-161. doi:10.1038/s41580-021-00415-0

Viscomi C, Zeviani M. Strategies for fighting mitochondrial diseases. *J Intern Med*. 2020;287(6):665-684. doi:10.1111/joim.13046

Wang S, Chen Y, Li X, et al. Emerging role of transcription factor EB in mitochondrial quality control. *Biomed Pharmacother*. 2020;128:110272. doi:10.1016/j.biopha.2020.110272

Wang, Y., Huang, Y., Liu, J., Zhang, J., Xu, M., You, Z., Peng, C., Gong, Z., & Liu, W. (2020). Acetyltransferase GCN5 regulates autophagy and lysosome biogenesis by targeting TFEB. *EMBO reports*, 21(1), e48335. <https://doi.org/10.15252/embr.201948335>

Wang, C., Niederstrasser, H., Douglas, P. M., Lin, R., Jaramillo, J., Li, Y., Oswald, N. W., Zhou, A., McMillan, E. A., Mendiratta, S., Wang, Z., Zhao, T., Lin, Z., Luo, M., Huang, G., Brekken, R. A., Posner, B. A., MacMillan, J. B., Gao, J., & White, M. A. (2017). Small-molecule TFEB pathway agonists that ameliorate metabolic syndrome in mice and extend *C. elegans* lifespan. *Nature communications*, 8(1), 2270. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02332-3>

Wang L, Shen HM. Seeing is believing: a novel tool for quantitating mitophagy. *Cell Res*. 2020;30(9):715-716. doi:10.1038/s41422-020-0360-3

Wang, S., Chen, Y., Li, X., Zhang, W., Liu, Z., Wu, M., Pan, Q., & Liu, H. (2020). Emerging role of transcription factor EB in mitochondrial quality control. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 128, 110272. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110272>

Wang S, Long H, Hou L, et al. The mitophagy pathway and its implications in human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):304. Published 2023 Aug 16. doi:10.1038/s41392-023-01503-7

Williams JA, Ding WX. Mechanisms, pathophysiological roles and methods for analyzing mitophagy - recent insights. *Biol Chem*. 2018;399(2):147-178. doi:10.1515/hsz-2017-0228

Williams JA, Zhao K, Jin S, Ding WX. New methods for monitoring mitochondrial biogenesis and mitophagy in vitro and in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017;242(8):781-787. doi:10.1177/1535370216688802

Xiao, Q., Yan, P., Ma, X., Liu, H., Perez, R., Zhu, A., Gonzales, E., Tripoli, D. L., Czerniewski, L., Ballabio, A., Cirrito, J. R., Diwan, A., & Lee, J. M. (2015). Neuronal-Targeted TFEB Accelerates Lysosomal Degradation of APP, Reducing A β Generation and Amyloid Plaque Pathogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(35), 12137–12151. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0705-15.2015>

Xu, Y., Ren, J., He, X., Chen, H., Wei, T., & Feng, W. (2019). YWHA/14-3-3 proteins recognize phosphorylated TFEB by a noncanonical mode for controlling TFEB cytoplasmic localization. *Autophagy*, 15(6), 1017–1030. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1569928>

Xu, J., Zhang, X. Q., & Zhang, Z. (2020). Transcription factor EB agonists from natural products for treating human diseases with impaired autophagy-lysosome pathway. *Chinese medicine*, 15(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s13020-020-00402-1>

Yamano K, Youle RJ. PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy*. 2013;9(11):1758-1769. doi:10.4161/auto.24633

Yang M, Liu E, Tang L, et al. Emerging roles and regulation of MiT/TFE transcriptional factors. *Cell Commun Signal*. 2018;16(1):31. Published 2018 Jun 15. doi:10.1186/s12964-018-0242-1

Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*. 2019;8(4):379. Published 2019 Apr 25. doi:10.3390/cells8040379

Yapa NMB, Lisnyak V, Reljic B, Ryan MT. Mitochondrial dynamics in health and disease. *FEBS Lett*. 2021;595(8):1184-1204. doi:10.1002/1873-3468.14077

Yin, Q., Jian, Y., Xu, M., Huang, X., Wang, N., Liu, Z., Li, Q., Li, J., Zhou, H., Xu, L., Wang, Y., & Yang, C. (2020). CDK4/6 regulate lysosome biogenesis through TFEB/TFE3. *The Journal of cell biology*, 219(8), e201911036. <https://doi.org/10.1083/jcb.201911036>

Yin Y, Shen H. Common methods in mitochondrial research (Review). *Int J Mol Med*. 2022;50(4):126. doi:10.3892/ijmm.2022.5182

Yoo SM, Jung YK. A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. *Mol Cells*. 2018 Jan 31;41(1):18-26. doi: 10.14348/molcells.2018.2277. Epub 2018 Jan 23. PMID: 29370689; PMCID: PMC5792708.

Zhang, W., Li, X., Wang, S., Chen, Y., & Liu, H. (2020). Regulation of TFEB activity and its potential as a therapeutic target against kidney diseases. *Cell death discovery*, 6, 32. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0265-4>

Zhang Z, Yan J, Bowman AB, Bryan MR, Singh R, Aschner M. Dysregulation of TFEB contributes to manganese-induced autophagic failure and mitochondrial dysfunction in astrocytes. *Autophagy*. 2020;16(8):1506-1523. doi:10.1080/15548627.2019.1688488

Zhitomirsky B, Yunaev A, Kreiserman R, Kaplan A, Stark M, Assaraf YG. Lysosomotropic drugs activate TFEB via lysosomal membrane fluidization and consequent inhibition of mTORC1 activity. *Cell Death Dis*. 2018;9(12):1191. Published 2018 Dec 13. doi:10.1038/s41419-018-1227-0

Zhou, X., Yang, J., Zhou, M., Zhang, Y., Liu, Y., Hou, P., Zeng, X., Yi, L., & Mi, M. (2019). Resveratrol attenuates endothelial oxidative injury by inducing autophagy via the activation of transcription factor EB. *Nutrition & metabolism*, 16, 42. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0371-6>

Zhu, L., Yuan, Y., Yuan, L., Li, L., Liu, F., Liu, J., Chen, Y., Lu, Y., & Cheng, J. (2020). Activation of TFEB-mediated autophagy by trehalose attenuates mitochondrial dysfunction in cisplatin-induced acute kidney injury. *Theranostics*, 10(13), 5829–5844. <https://doi.org/10.7150/thno.44051>

